



Universidad Autónoma de Madrid  
Departamento de Bioquímica

**Caracterización fenotípica, transcriptómica y funcional de  
células germinales pluripotentes reprogramadas a través  
de la variación en la concentración de oxígeno ambiental**

TESIS DOCTORAL

Pilar López Iglesias  
Madrid, 2013





DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA  
FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

**Caracterización fenotípica, transcriptómica y funcional de  
células germinales pluripotentes reprogramadas a través  
de la variación en la concentración de oxígeno ambiental**

TESIS DOCTORAL

Memoria presentada por Pilar López Iglesias,  
Licenciada en Bioquímica por la  
Universidad Autónoma de Madrid,  
para optar al grado de Doctor

Trabajo dirigido por la Dra. María Paz De Miguel González

Hospital Universitario La Paz, IdiPaz



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID  
FACULTAD DE MEDICINA

**AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR DE TESIS PARA  
SU PRESENTACIÓN**

MARÍA PAZ DE MIGUEL GONZÁLEZ, Doctora en Ciencias Biológicas y Directora del Laboratorio de Ingeniería Celular de la Unidad de Investigación del Hospital Universitario La Paz de Madrid

CERTIFICA QUE:

**PILAR LÓPEZ IGLESIAS**, con DNI 79016266 L, Licenciada en Bioquímica por la Universidad Autónoma de Madrid, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado: **“Caracterización fenotípica, transcriptómica y funcional de células germinales pluripotentes reprogramadas a través de la variación en la concentración de oxígeno ambiental”** y que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para su exposición y defensa como tesis doctoral.

Para que conste y surta los efectos oportunos, firma el presente certificado. En Madrid,  
4 de Noviembre de 2013

Fdo.: Dra. María Paz De Miguel González



*A mis padres*



## *Agradecimientos*

---





Deseo expresar mi agradecimiento a todos aquellos que han hecho posible la finalización de este trabajo y en particular a las siguientes personas:

En primer lugar, me gustaría dar las gracias a la directora de esta Tesis doctoral, la Dra. María Paz De Miguel González. Su formación continua, su paciencia y sobre todo su apoyo han hecho que mi estancia durante todo este proyecto de investigación en su laboratorio haya sido una experiencia no solo agradable sino instructiva, ayudándome a ser una mejor estudiante e investigadora. Gracias por enseñarme todo lo que sé sobre las células germinales primordiales y las células madre y transmitirme la fascinación que siento por el estudio de las mismas. Gracias también por las horas que has pasado corrigiendo todos mis trabajos, informes y presentaciones, poniendo todo tu empeño en quedaran siempre perfectos.

Me siento afortunada, por haber trabajado en el Laboratorio de Ingeniería Celular, pudiendo conocer a gente tan maravillosa como Fátima Domínguez, dispuesta siempre a ayudar, a escuchar y sobre todo a apoyarme en los momentos difíciles, a Sherezade Fuentes, por poder contar con ella siempre, dentro y fuera del laboratorio, a Alejandro Blázquez, por enseñarme lo que era un laboratorio en mi primer año, cuando me sentía como un elefante en una cacharrería y por hacerme reír con sus mil anécdotas, a Diego Sainz de la Maza, por su infinita paciencia, a Massimo Chiesa por ayudarme con sus sabios y profesionales consejos y en definitiva a todas las personas que han pasado y que aún siguen en el laboratorio, por hacer de él no solo un lugar de trabajo sino un sitio especial en el que siempre ha predominado la amistad, las risas y el compañerismo.

Entre mis compañeros me gustaría agradecer especialmente la infinita ayuda y el apoyo incondicional del Dr. García Tuñón, al que admiro profundamente como científico y persona y considero un ejemplo de tesón, constancia y buen hacer, cualidades indispensables en la labor científica. Gracias por tu eterno optimismo, por allanarme el camino y por hacerme ver siempre que la luz al final del túnel estaba muy cerquita. Y finalmente a Yago Alcaina, mi fiel compañero en esta aventura quijotesca, gracias por mostrarme que virtudes como la templanza, la paciencia, la sabiduría, el sacrificio, el infinito buen humor y la confianza pueden residir en una misma persona. Simplemente no podría haber encontrado un compañero mejor.

A los doctores Natalia Tapia, Marcos Araúzo-Bravo, Sagrario Ortega, Manuel Nistal, Javier Regadera y Hans Schöler por su aportación a este trabajo y su apreciada colaboración con nuestro laboratorio.

A Jesús Vidal de la Unidad de Radiofísica del Hospital La Paz por su interés en nuestro trabajo y su ayuda desinteresada, y a Salvador Guerrero del Instituto de Parasitología y Biomedicina "López - Neyra" (CSIC, Granada), por ofrecer su amplio conocimiento en la Citometría de Flujo, su ayuda y su tiempo a mis llamadas de S.O.S.

Y en general a la Unidad de Investigación, a la unidad de Anatomía Patológica, y al Biobanco del Hospital La Paz, formadas por personas que siempre se han mostrado dispuestas a ayudar cuando ha sido necesario.

Por último agradecer el infinito apoyo y comprensión de mis amigos, Rafael Bonilla y Nuria Olbricht , y finalmente a mi familia.



## *Resumen*

---



Recientemente, estudios en genes implicados en el proceso de reprogramación celular han conducido a la identificación de un grupo de factores de transcripción claves (Klf4, c-Myc, Oct4, Nanog, Lin28, Sox2) que son capaces de convertir una célula somática adulta a un estado pluripotente, y dando lugar a las llamadas Células Madre Pluripotentes Inducidas (iPSC). En posteriores estudios, se ha identificado que el proceso de reprogramación puede ser llevado a cabo más fácilmente en células que se encuentran en un estado más primitivo en el desarrollo.

En consecuencia, en el estudio de inducción de pluripotencia un modelo importante es el uso de células germinales primordiales (PGCs), los precursores embrionarios de los gametos, las cuales ya expresan los genes de pluripotencia Oct4, Sox2, Nanog y Lin28. A pesar de la expresión de dichos genes, las PGCs son células unipotentes, ya que solo dan lugar a los gametos. Sin embargo, las PGCs pueden ser reprogramadas fácilmente *in vitro* en un tipo de células pluripotentes, las llamadas Células Germinales Embrionarias (EGCs), constituyendo una buena herramienta para la caracterización del proceso de reprogramación.

Los datos aportados en nuestro estudio muestran que la disminución de la concentración de O<sub>2</sub> ambiental hasta un 3%, induce pluripotencia en PGCs y sugiere que las dos propiedades principales de las células madre clásicamente unidas, la pluripotencia y la autorrenovación, están diferencialmente reguladas. En las PGCs, la hipoxia estabiliza al factor HIF1, que a su vez induce desregulación de la expresión de Oct4, induce la expresión de genes asociados al metabolismo anaeróbico y variaciones en los niveles de expresión de genes asociados a la remodelación de la cromatina en las PGCs. La pluripotencia de las PGCs inducida por la hipoxia es demostrada *in vivo* a través de la capacidad de estas células de agregación a mórulas e integración en blastocistos hospedadores de ratón. Sin embargo, la capacidad de autorrenovación ilimitada en las PGCs reprogramadas no es lograda por la hipoxia, probablemente debido a la falta de inducción de algunos genes claves en proceso de reprogramación celular. Estudios de expresión génica revelaron que las células obtenidas bajo dichas condiciones de hipoxia se encuentran en un estado intermedio en el proceso de reprogramación celular, no alcanzando la etapa de estabilización. Entre los genes inducidos por la hipoxia, se reveló un gran incremento en la expresión de PPAR $\gamma$  y Bnip3. El gen PPAR $\gamma$  parece tener un papel crucial en el mantenimiento de la homeostasis redox celular y la reducción del daño oxidativo, mientras que Bnip3 parece ser el principal inductor del proceso de mitogafía celular, el cual puede tener un papel crítico en el mantenimiento de la homeostasis celular. La función de ambos genes parece estar relacionada con mecanismos de adaptación a la disminución de la concentración de oxígeno ambiental y mantenimiento de la supervivencia celular en las PGCs sometidas a hipoxia.

## *Summary*

---





Recently, studies on genes involved in the process of cellular reprogramming have led to the identification of a defined set of key transcription factors (Klf4, c-Myc, Oct4, Nanog, Lin28, Sox2) that can convert an adult somatic cell into a pluripotent state, giving rise to the so-called Induced Pluripotent Stem Cells (iPSC). Subsequent studies have identified that the reprogramming process is achieved more easily in cells in a more primitive state of development.

Accordingly, in the study of pluripotency induction, an important model could be the use of primordial germ cells (PGCs), the embryonic precursors of gametes, which already express some pluripotency genes such as Oct4, Sox2, Nanog and Lin28. Despite pluripotent gene expression, PGCs are unipotent cells, as they only give rise to the gametes. However, PGCs are easily reprogrammed *in vitro* towards a pluripotent cell type called Embryonic Germ Cells (EGCs), making them a good model for the characterization of the reprogramming process.

The data provided in our study show that the decrease in ambient O<sub>2</sub> concentration down to 3% induces pluripotency in PGCs and suggests that the two main characteristics of stem cells classically linked, self-renewal and pluripotency, are differentially regulated. In PGCs, hypoxia stabilizes HIF1, which in turn induces deregulated expression of Oct4 levels. Hypoxia also induces the expression of genes associated with anaerobic metabolism, and changes in the expression levels of genes associated with chromatin remodelling. Induction of PGC pluripotency by hypoxia is demonstrated *in vivo* by the ability of these cells to aggregate and integrate into a host morulae and blastocysts respectively. However, these cells lack the unlimited self-renewal ability usually associated with stem cells. This can be due to the lack of induction of some key genes in the cellular reprogramming process. Gene expression studies revealed that cells obtained under these hypoxic conditions are at an intermediate state in the process of cellular reprogramming, not reaching the stabilization phase. Among genes induced by hypoxia, a large increase in gene expression of Bnip3 and PPAR $\gamma$  was observed. PPAR $\gamma$  appears to play a crucial role in maintaining cell redox homeostasis and reducing oxidative damage, whereas Bnip3 appears to be the main inductor in mitophagy processes which maintains cellular homeostasis. The function of both genes appears to be related to cellular adaptation to diminished oxygen concentration and maintenance of cell survival in PGC subjected to hypoxia.



*"Hay algo más importante que la lógica: la imaginación"*

Alfred Hitchcock



## ÍNDICE

<b>Resumen.....</b>	<b>1</b>
<b>Índice.....</b>	<b>10</b>
<b>Abreviaturas.....</b>	<b>15</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>20</b>
<b>1. Células Madre pluripotentes.....</b>	<b>22</b>
1.1. Células Madre Embrionarias.....	22
1.1.1. Características.....	22
1.1.2. Genes relacionados con pluripotencia.....	23
1.1.3. Vías de señalización implicadas en la pluripotencia y autorrenovación de ESC.....	24
1.2. Otros tipos de células madre pluripotentes.....	25
1.2.1. Células madre pluripotentes inducidas.....	26
1.2.2. Células madre de Epiblasto.....	28
<b>2. Células Germinales embrionarias .....</b>	<b>29</b>
2.1. Origen de las Células Germinales Embrionarias.....	29
2.2. Migración de las células germinales primordiales y colonización de las crestas genitales embrionarias.....	30
2.3. Células Germinales Embrionarias y células de Carcinoma Embrionario.....	31
2.4. Células Germinales embrionarias como modelo de estudio de la reprogramación celular.....	33
<b>3. Hipoxia .....</b>	<b>35</b>
3.1. Factores inducidos por Hipoxia.....	35
3.2. Hipoxia y células madre .....	38
3.3. Hipoxia y metabolismo celular.....	40
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>42</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>45</b>
<b>1. Animales de estudio.....</b>	<b>47</b>

<b>2. Cultivo de células germinales primordiales (PGCs) y células germinales embrionarias (EGCs) de ratón.....</b>	<b>48</b>
2.1. Aislamiento y cultivo PGCs.....	48
2.1.1. Tampones y soluciones.....	48
2.1.2. Medios de cultivo.....	48
2.1.3. Fijador.....	49
2.1.4. Disección de embriones de 8,5 <i>d.p.c.</i> y cultivo de PGCs.....	49
2.2. Identificación de PGCs y EGCs.....	52
2.2.1. Tinción de fosfatasa alcalina.....	52
2.2.2. Recuento celular.....	52
2.2.3. Estudio Estadístico.....	52
2.3. Derivación de EGCs.....	52
<b>3. Líneas celulares.....</b>	<b>53</b>
<b>4. Técnica de Inmunofluorescencia .....</b>	<b>54</b>
4.1. Anticuerpos primarios (tabla 2).....	54
4.2. Anticuerpos secundarios (tabla 3).....	54
4.3. Doble IF indirecta frente a marcadores pluripotentes en PGCs/EGCs.....	55
4.4. Doble IF indirecta frente a HIF-1 $\alpha$ en PGCs.....	56
<b>5. Citometría de Flujo.....</b>	<b>56</b>
5.1. Citometría de flujo analítica en PGCs.....	57
5.1.1. ICC anti-SSEA1.....	57
5.1.2. Adquisición celular por Citometría de Flujo.....	57
5.1.3. Análisis estadístico.....	58
5.2. Aislamiento de PGCs por Cell Sorting .....	58
5.2.1. ICC anti-SSEA1.....	58
5.2.2. Citometría de Flujo “Cell Sorting”.....	58
<b>6. Análisis de la expresión génica de PGCs por <i>Microarrays</i>.....</b>	<b>59</b>
6.1. Preparación de las muestras.....	59

6.1.1. Extracción de RNA de las células PGCs.....	59
6.1.2. Aislamiento y pre-amplificación del cDNA de las células PGCs.....	60
6.2. Hibridación de las muestras en el chip de <i>Microarrays</i> .....	61
6.3. Procesamiento y análisis estadístico de datos del <i>Microarrays</i> .....	61
<b>7. Análisis por PCR a tiempo real o cuantitativa (RT-qPCR).....</b>	<b>62</b>
7.1. Extracción de RNA.....	62
7.2. Reacción de transcripción reversa.....	62
7.3. Pre-amplificación del cDNA.....	62
7.4. Amplificación de cDNA mediante RT-qPCR.....	63
<b>8. Agregación de células PGCs/EGCs a mórulas de 8 células para la generación de quimeras.....</b>	<b>64</b>
8.1. Aislamiento de células PGCs/EGCs por “cell picking” manual.....	64
8.2. Protocolo de agregación.....	64
8.2.1. Materiales.....	64
8.2.2. Protocolo de hormonación para superovulación de hembras donantes.....	65
8.2.3. Protocolo de obtención y lavado de embriones de las hembras donantes.....	65
8.2.4. Agregación .....	66
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>67</b>
<b>1. Efecto de la hipoxia en el crecimiento y la reprogramación de PGCs.....</b>	<b>69</b>
<b>2. Caracterización de las hiEGL.....</b>	<b>70</b>
2.1. Caracterización fenotípica de EGCs obtenidas bajo condiciones de hipoxia.....	70
2.2. Caracterización funcional de las hiEGLs <i>in vivo</i> .....	72
2.3. Caracterización de la expresión génica diferencial de las células hiEGL mediante <i>microarrays</i> de DNA.....	73
2.3.1. Caracterización de hiEGL mediante <i>Cell Sorting</i> .....	73
2.3.2. Análisis de la expresión génica diferencial de hiEGL por <i>Microarrays</i> .....	74
<b>3. Análisis del mecanismo de inducción de pluripotencialidad de las hiEGL por la hipoxia.....</b>	<b>81</b>
3.1. Estudio del principal sistema molecular de respuesta a hipoxia: HIF's .....	81

3.1.1. Análisis por <i>Microarrays</i> de HIF y genes relacionados con HIF en hiEGL.....	81
3.1.2. Detección de la proteína HIF-1 $\alpha$ .....	82
3.1.3. Estudio funcional de la implicación de HIF's en la inducción de pluripotencialidad de hiEGL a través del uso de fármacos.....	83
3.2. Estudio del principal inductor de reprogramación celular: Oct4.....	85
3.2.1 Análisis de la expresión de Oct4-GFP en hiEGL.....	85
3.2.2. Oct-4 en el proceso reprogramación celular de las PGCs.....	87
3.2.2.1. Cinética de la expresión de Oct-4 GFP en hiEGLs.....	87
3.2.2.2. Estabilidad en la expresión de Oct4 en hiEGLs.....	88
3.2.2.3. Eficiencia de la inducción de pluripotencialidad en PGC por hipoxia.....	89
3.2.2.4. Cuantificación de la expresión Oct4-GFP en la población de hiEGL reprogramada.....	89
3.2.3. Detección de Oct4 endógeno en hiEGL.....	90
<b>4. Estudio de otros mecanismos inducidos por la hipoxia en las PGCs.....</b>	<b>91</b>
4.1. Análisis cuantitativo de la expresión génica de PPAR $\gamma$ y Bnip3 en hipoxia por RT-qPCR.....	91
4.2. Estudio funcional de la implicación de PPAR $\gamma$ en la inducción de pluripotencia de hiEGL....	92
4.3. Papel de la sobreexpresión de Bnip3 en hipoxia: estudio morfológico de las hiEGL a través de Microscopía electrónica.....	92
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>94</b>
1. Hipoxia en la inducción de potencialidad en células diferenciadas.....	95
2. Eficiencia de inducción de pluripotencia en PGCs por hipoxia.....	95
3. La hipoxia induce características de pluripotencialidad pero no de inmortalidad en las hiEGL.....	96
4. Las hiEGL son más parecidas a las EGCs que a otros tipos de células pluripotentes o a PGCs unipotentes.....	97
5. La inducción de pluripotencialidad en las PGCs por hipoxia está mediada por HIF-1.....	99
6. La hipoxia provoca variaciones en la expresión de Oct4 en PGC.....	101
7. La hipoxia afecta a las diferentes fases del proceso de reprogramación de las hiEGL.....	103



8. Estudio de la relación entre hipoxia y metabolismo en las hiEGL.....	103
9. Estudio de la relación entre hipoxia y epigenética en las hiEGL.....	105
10. La hipoxia favorece la supervivencia celular y protege del daño oxidativo en hiEGL.....	108
10.1. La hipoxia podría inducir mecanismos de protección frente al daño oxidativo a través de la expresión de PPAR $\gamma$ en PGCs .....	108
10.2. La hipoxia induce procesos de autofagia en hiEGL a través de la expresión de Bnip3.....	109
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>111</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>114</b>

## *Abreviaturas*

---



**Ac:** acetilación

**AGM:** región Aorta-Gónada-Mesonefros

**ARNT:** *Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator*

**ATCC:** *American Type Culture Collection*

**bFGF:** Factor de Crecimiento Fibroblástico básico (*Basic Fibroblast Growth Factor*), también FGF2.

**BMP:** *Bone Morphogenetic Protein*

**Bnip3:** *Bcl-2/adenovirus E1B 19-kDa interacting protein 3.*

**BSA:** Albúmina Sérica Bovina

**CD9:** *Cluster of Differentiation 9*

**CDK:** *Cyclin Dependent Kinase*

**COS-7:** CV-1 en Origen que contiene SV40

**CXCR4:** C-X-C chemokine receptor type 4

**DAPI:** 4',6-Diamidino-2-fenilindol diclorhidrato

**DMEM:** *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

**DNMT:** *DNA Methyltransferase*

**d.p.c:** días después del coito (*days post coitum*)

**EBs:** Cuerpos Embrioides (*embryoid bodies*)

**ECC:** Célula de Carcinoma Embrionario (*Embryonal Carcinoma Cell*)

**EDTA:** Ácido Etilendiaminotetraacético

**EGC:** Célula Germinal Embrionaria (*Embryonic Germ Cell*)

**ENO1:** Enolasa 1

**EpiSC:** Célula Madre del Epiblasto (*Epiblast stem cell*)

**EPO:** eritropoyetina

**ESC:** Célula Madre Embrionaria (*Embryonic stem cell*)

**hESC:** ESC humanas

**mESC:** ESC de ratón

**FACS:** Citometría de Flujo Fluorescente (*Fluorescence-Activated Cell Sorting*)

**FBS:** Suero Bovino Fetal (*Fetal Bovine serum*)

**FIH1:** *Factor inhibiting HIF 1*

**GAPDH:** Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

**GCNA:** *Germ Cell Nuclear Antigen*

**GCTM:** *Germ Cell Tumor of the Mediastinum*

**GFP:** Proteína Fluorescente Verde (*Green fluorescent protein*)

**GLUT:** Transportador de Glucosa

**GMEM:** Glasgow Minimum Essential Medium

**gPS:** Células Madre Pluripotentes derivadas de la línea germinal

**GSC:** células madre germinales (*Germline Stem Cell*).

**GSK3:** *Glycogen Synthase Kinase 3*

**HIF:** Factor Inducido por Hipoxia (*Hypoxia inducible factor*)

**HLA1:** *Human Leukocyte Antigen*

**HMG- box:** *High Mobility Group box*

**HRE:** Elemento de Respuesta a Hipoxia (*Hypoxia Response Elements*)

**HSC:** Célula Madre Hematopoyética

**ICC:** Inmunocitoquímica

**ICM:** Masa Celular Interna (*Inner Cell Mass*)

**Id:** *inhibitor of differentiation*

**IFITM3:** *Interferon-induced Transmembrane Protein 3*

**KL:** Ligando de Kit = SCF (*Stem Cell Factor*)

**KO:** *knockout*

**iPSC:** Célula Madre Pluripotente inducida (*induced pluripotent stem cell*)

**LDHA:** Lactato Deshidrogenasa A

**LIF:** Factor Inhibidor de la Leucemia (*Leukemia Inhibitory Factor*)

**LIFR:** Receptor de LIF

**MAPK:** *Mitogen-Activated Protein Kinases*

**Me:** Metilación

**MED7:** *Mediator complex subunit 7*

**MEF:** Fibroblasto Embrionario de Ratón (*mouse embryonic fibroblast*)

**MEK:** *Mitogen-activated protein kinase/Extracellular signal-Regulated Kinase (ERK) Kinase*

**Mvh:** homólogo de Vasa en ratón

**NPC:** Célula Precursora Neuronal (*neural precursor cell*)

**NSC:** Célula Madre Neural (*neural stem cell*)

**ODD:** *oxygen degradation domain*

**PBS:** Solución tampón Fosfato Salino

**PDK1:** piruvato deshidrogenasa quinasa 1

**PGC:** Célula Germinal Primordial (*primordial germ cell*)

**PHD:** *Prolyl Hydroxylase*

**PTEN:** *Phosphatase and Tensin homolog*

**ROS:** Especies reactivas de oxígeno

**SCF:** Stem Cell Factor = KL (factor de células madre)

**SDF-1:** *chemokine stromal cell-derived factor 1*

**SNRPN:** *Small Nuclear Ribonucleoprotein Polypeptide N*

**SRY:** *Sex determining Region Y*

**SSEA:** Antígeno específico de estado (*Stage Specific Embryonic Antigens*)

**STAT3:** *Signal Transducer and Activator of Transcription*

**STO:** *Sandoz Thioguanine- and Ouabain-resistant cell line*

**TBS:** *Tris-Buffered Saline*

**TERT:** Transcriptasa Inversa de la Telomerasa

**TGF- $\beta$ :** *Transforming Growth Factor  $\beta$*

**Thy1:** *Thymus cell antigen 1*

**TNAP:** Fosfatasa Alcalina No específica de Tejido (*Tissue non-specific alkaline phosphatase*)

**TSA:** Tricostatina A

**VEGFA:** Factor de crecimiento vascular endotelial (*Vascular endothelial growth factor*)

**Wild type:** fenotipo silvestre

**2i:** 2 inhibidores (*2 inhibitors*)

## *Introducción*

---





## 1. Células Madre pluripotentes

La pluripotencia se define como el potencial de una célula para diferenciarse a células de las tres hojas embrionarias: endodermo, mesodermo y ectodermo. Las células madre pluripotentes pueden diferenciarse a otros tipos celulares más especializados pero a la vez mantienen la capacidad de renovarse a sí mismas, lo que se denomina autorrenovación y constituye una característica única de las células madre. Estas células han sido ampliamente estudiadas debido a su prometedor potencial en su aplicación en medicina regenerativa. Las células madre pueden clasificarse en base a su grado de “potencialidad”. Las células madre totipotentes son aquéllas que se encuentran desde el estadio de cigoto hasta el de 4 células en el preembrión y pueden dar lugar a todos los tejidos embrionarios y extraembrionarios. Las células madre pluripotentes son aquéllas que pueden diferenciarse a cualquier tipo celular del animal adulto pero no a tejidos extraembrionarios, como la placenta. Las células multipotentes son aquéllas que sólo pueden dar lugar a una variedad limitada de tipos celulares, como por ejemplo las células madre hematopoyéticas las cuales pueden diferenciarse en células sanguíneas. En último lugar se encuentran las células precursoras unipotentes las cuales sólo pueden dar a un tipo celular, como las células germinales primordiales las cuales son los precursores de los gametos adultos.

*In vivo*, la presencia de células madre pluripotentes es transitoria durante el desarrollo embrionario temprano. Sin embargo líneas celulares inmortales con estas mismas propiedades pueden ser obtenidas *in vitro* y cultivadas indefinidamente bajo condiciones específicas en laboratorio.

### 1.1. Células madre embrionarias

#### 1.1.1. Características

Las células madre embrionarias (ESC) son células pluripotentes derivadas de la masa celular interna (ICM) del embrión de mamífero en estadio de blastocisto. Estas células proliferan mientras se mantienen indiferenciadas y a la misma vez retienen su capacidad de diferenciación a tejidos de las tres hojas embrionarias. En los años 80 se consiguieron derivar las primeras líneas de células madre pluripotentes a partir de embriones de ratón (mESC). Éstas se derivaron en condiciones de cultivo en las que se empleó una monocapa de fibroblastos embrionarios de ratón como células nutricias y medio de cultivo que contenía suero bovino fetal. Para comprobar la pluripotencialidad de las células madre, normalmente se realizan varios ensayos que miden la capacidad de las células para diferenciarse en tejidos de las tres hojas embrionarias. *In vitro*, las células ESC pueden formar agregados que crecen en suspensión y se denominan cuerpos embrioides (EBs). Estos cuerpos embrioides son estructuras esféricas que mimetizan un desarrollo embrionario post implantación rudimentario, en los que pueden encontrarse tejidos de las 3 hojas embrionarias (Desbaillets et al., 2000). *In vivo*, cuando las células madre se inyectan de forma isogénica, es decir, en individuos de la misma especie, forman teratomas

(Jaenisch y Young, 2008). Un teratoma es un tumor benigno que contiene células de endodermo, mesodermo y ectodermo. Finalmente, las células madre pluripotentes pueden contribuir ampliamente a la formación de tejidos en animales quimera. Estos animales quimera provienen de un blastocisto hospedador en el que se inyecta un pequeño número de ESC y luego son implantados en el útero de hembras de ratón pseudopreñadas permitiéndose su normal desarrollo embrionario y viendo su contribución a los diferentes tejidos (Jaenisch y Young, 2008). La pluripotencialidad de las mESC se comprobó tanto *in vivo* como *in vitro* ya que las ESC pueden generar teratomas cuando se inyectan en ratones adultos y formar cuerpos embrioides cuando son cultivadas (Evans y Kaufman, 1981; Martin, 1981).

Más tarde, en 1998, se consiguieron aislar células madre embrionarias humanas (hESC) provenientes de blastocistos humanos defectuosos (Thomson et al., 1998). Estas células son también pluripotentes, como se comprobó *in vitro* exclusivamente, como es obvio, en su formación de cuerpos embrioides (Thomson et al., 1998).

Tanto las células madre embrionarias de ratón como las humanas crecen en colonias compartiendo la mayoría pero no todas las características con las células pluripotentes del embrión *in vivo*. Estas características incluyen la expresión de antígenos de membrana como los de la familia SSEA (Stage Specific Embryonic Antigens), los de la familia de queratán sulfato (Tra1-60, Tra1-81), la proteína antigénica CD9 y los marcadores GCTM2 y GCT343, Thy y HLA1 (International Stem Cell Initiative, 2007). También expresan genes relacionados con el desarrollo y la pluripotencialidad como Oct4, Sox2, Nanog, Tdgf1, Dnmt3b, Gabrb3, y Gdf3 (International Stem Cell Initiative, 2007). Las células madre embrionarias también comparten actividades enzimáticas como la fosfatasa alcalina no específica de tejido (TNAP) y la actividad telomerasa, implicada en el mantenimiento de la longitud de los telómeros, condición esencial para la continuada autorrenovación de las mismas (Counter, 1996). Estos marcadores característicos de las células madre pluripotentes se pierden rápidamente tras la diferenciación. Existen también algunas diferencias entre mESC y las hMESC, como por ejemplo la expresión diferencial de los glucolípidos denominados antígenos embrionarios específicos de estado 1 en ratón y 3 /4 en humano (SSEA1, SSEA3/4), la expresión del receptor de LIF presente en mESC y ausente en hESC o la morfología de las células, redondeadas con límites muy definidos en hESC humanas y más variable en mESC (Ginis et la., 2004).

### **1.1.2. Genes relacionados con pluripotencia**

En las células madre embrionarias el estado de pluripotencia está gobernado por un núcleo de factores de transcripción compuesto por Oct4, Sox2 y Nanog. Ratones *knockout* (KO) para cada uno de estos factores son letales embrionarios (Nichols et al., 1998; Avilion et al., 2003; Mitsui et al., 2003). El factor de transcripción Oct4 también conocido como POU5F1 (POU domain, class 5, transcription factor 1) es miembro de la familia de factores de transcripción con un homeodominio o

dominio de unión a DNA de clase POU (PIT/OCT/UNC) los cuales se unen a secuencias específicas de DNA (Rosner et al., 1990). El mantenimiento de los niveles de Oct4 en las células madre embrionarias es crítico y tanto su aumento o disminución de su expresión conduce a las células fuera del estado de pluripotencia (Niwa et al., 2000). El gen Sox2 codifica para la proteína SOX2, también conocida como SRY-box 2, la cual es un factor de transcripción que posee un dominio de unión a DNA de tipo HMG-box (Avilion et al., 2003). Células madre embrionarias mutantes para Sox2 tienden a diferenciarse espontáneamente. Oct4 y Sox2 pueden formar un heterodímero en las células madre embrionarias y Sox2 puede regular la expresión de Oct4 (Masui et al., 2007). Nanog es un factor de transcripción con un homeodominio que funciona como dímero (Mullin et al., 2008). La sobreexpresión de Nanog libera a las mESC de su requerimiento de LIF, una citoquina de la familia de IL-6, crítica en el mantenimiento de la pluripotencialidad (Chambers et al., 2003). A través de estudios del genoma completo se han identificado genes que interaccionan a la vez con estos tres factores como genes codificantes de factores de transcripción (OCT4, SOX2, NANOG, STAT3) y componentes de las vías de señalización de TGF- $\beta$  (TDGF1, LEFTY2/EBAF) y Wnt (DKK1, FRAT2). Se ha establecido que Oct4, Sox2 y Nanog pueden unirse a sus propios promotores y formar un bucle interconectado de autorregulación génica (Boyer et al., 2005). Esto sugiere que la regulación del programa de pluripotencia de las ESC depende del conjunto de estos tres factores (Jaenisch y Young, 2008). Estos factores parecen ser diana de dos grupos de genes; un grupo que está activamente expresado en células ESC y otro que está silenciado pero preparado para su rápida expresión cuando las células sufren diferenciación (Boyer et al., 2005). Muchos de los genes que están transcripcionalmente silenciados están unidos a un grupo de proteínas llamadas Polycomb, las cuales silencian la expresión génica por medio de modificaciones epigenéticas (Boyer et al., 2006).

Se han identificado también otros factores de transcripción importantes de la red transcripcional de las ESC, como Klf4 (Jiang et al., 2008), c-Myc, Stat3 (Kidder et al., 2008) o Rest (Singh et al., 2008). Existen además otros reguladores como modificadores epigenéticos (Ez2h) (Surani et al., 2007) y modificadores post transcripcionales, como los microRNAs (miR-291-3p, miR-294, y miR-295) (Judson et al., 2009) que forman parte también del circuito regulador de pluripotencia de las ESC.

### **1.1.3. Vías de señalización implicadas en la pluripotencia y autorrenovación de las ESC**

Las mESC fueron originalmente cultivadas sobre células nutricias y en presencia de suero bovino fetal, los cuales constituyen una fuente de nutrientes y de factores de crecimiento para estas células. Varios estudios han identificado algunos componentes críticos suministrados por el suero y las células nutricias que mantienen el estado de pluripotencia de las mESC, entre ellos los factores LIF y BMPs. El mantenimiento de las mESC depende de la citoquina LIF. La vía de señalización por la cual LIF actúa para promover la autorrenovación de las mESC está bien estudiada. LIF se une a su receptor

de baja afinidad (LIFR) formando un heterodímero al cual se une también la subunidad gp130 (Smith et al., 1988). El dominio citoplasmático de gp130 se asocia a las quinasas JAK después de la dimerización estimulada por ligando. Estas quinasas JAK fosforilan al factor de transcripción STAT3 (Niwa et al., 1998), lo que conduce a su dimerización y posterior translocación al núcleo para la activación génica. Se cree que STAT3 juega un papel importante en la regulación de la autorrenovación versus diferenciación de las mESC. La sobreexpresión de una forma activada de STAT3, en ausencia de LIF, es suficiente para el mantenimiento de la pluripotencialidad (Matsuda et al., 1999).

Cuando las mESC crecen en condiciones de cultivo sin suero, LIF es insuficiente para mantener la pluripotencia de éstas. Las mESC también requieren la proteína BMP4 para su autorrenovación. El factor BMP4 es un miembro de la familia de las proteínas BMPs, el cual a su vez forma parte de la superfamilia de TGF- $\beta$ . La señalización por BMP4 es a través de receptores de tipo serín/treonín quinasa los cuales fosforilan a SMAD1 y conducen a la activación de las proteínas inhibidoras de la diferenciación (Ids). Se ha demostrado que LIF y BMP4 actúan de forma sinérgica para bloquear la diferenciación y mantener la pluripotencia en mESC (Ying et al., 2003).

## **1.2. Otros tipos de células madre pluripotentes**

Durante el desarrollo normal de un organismo las células mantienen o restringen su potencialidad. Es por ello que estos fenómenos, en los que una célula diferenciada aumenta su potencialidad, resultan extraordinariamente interesantes y suponen un modelo muy prometedor sobre el que trabajar para llegar a comprender tanto los procesos de determinación y diferenciación celular como los de adquisición de pluripotencialidad, en la fertilización y en el establecimiento de las poblaciones de progenitores en los diferentes tejidos. Bajo condiciones específicas *in vitro*, las células diferenciadas pueden revertir a un estado menos diferenciado mediante un proceso denominado reprogramación celular. Los cambios genéticos y moleculares necesarios para este proceso pueden ser provocados mediante diferentes métodos como la transferencia nuclear de células somáticas, la fusión celular con células pluripotentes, la incubación con extractos celulares de células pluripotentes, la derivación de células germinales embrionarias (EGCs) desde células germinales primordiales (PGCs) o mediante la expresión ectópica de factores de transcripción en células somáticas para la derivación de células madre pluripotentes inducidas (iPSCs). Existen distintos tipos de células madre pluripotentes que se diferencian principalmente en su origen. Además de células madre pluripotentes embrionarias (ESC) derivadas de la ICM, existen otro tipo de células madre derivadas del embrión, las Células Madre del Epiblasto (EpiSC) las cuales son aisladas justo antes de la gastrulación en el embrión postimplantacional. También se pueden obtener células madre pluripotentes a partir de células diferenciadas o de tejidos del organismo adulto, pero para su obtención es necesaria su

reprogramación celular *in vitro*. Entre ellas se encuentran las Células Madre Pluripotentes inducidas (iPSC) y las Células Germinales Embrionarias (EGC) derivadas de las células PGCs, las cuales serán el objeto de estudio de esta Tesis doctoral.

### **1.2.1. Células madre pluripotentes inducidas**

Recientemente, se produjo un gran avance en el estudio de la reprogramación celular cuando los investigadores Takahashi y Yamanaka demostraron en 2006 que células somáticas podían ser reprogramadas *in vitro* a un estadio más primitivo del desarrollo utilizando la expresión ectópica de sólo cuatro factores de transcripción. Los autores utilizaron como células somáticas fibroblastos embrionarios de ratón y mediante transducción por vectores retrovirales de los factores Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc consiguieron reprogramar estas células a células muy parecidas a las mESC, las cuales denominaron células madre pluripotentes inducidas (iPSC) (Takahashi y Yamanaka, 2006). Las iPSC obtenidas mostraron la morfología, propiedades de crecimiento y marcadores típicos de las ESC. Al ser trasplantadas subcutáneamente en ratones inmunodeficientes dieron lugar a tumores los cuales contenían una gran variedad de tejidos de las tres hojas embrionarias. También se inyectaron en blastocistos y se comprobó que las iPSC contribuían a células del embrión del ratón (Takahashi y Yamanaka, 2006). Poco después se consiguieron derivar iPSC de fibroblastos humanos, utilizando tanto los mismos 4 factores mostrados arriba (Takahashi et al., 2007) como una segunda combinación con Oct4, Sox2, Nanog y Lin28 (Yu et al., 2007). Las líneas de iPSC humanas muestran unas características muy similares a las ESC tales como la morfología, el patrón de expresión génica, la reactivación del cromosoma X, la actividad telomerasa y la generación de quimeras viables con contribución a la línea germinal (Maherali et al., 2007; Marion et al., 2009). Las principales diferencias con respecto a las ESC se encuentran en su estado epigenético, como los patrones de metilación del DNA (Doi et al., 2009; Deng et al., 2009) o la ocasional expresión bialélica de genes de impronta (Pick et al., 2009). Algunas de estas diferencias pueden ser debidas a que las iPSC (sobre todo de bajo pase) mantienen la “memoria epigenética” de las células somáticas originales y esta memoria puede influir en el potencial de diferenciación de estas células (Kim et al., 2010).

La reprogramación es un proceso ineficiente y estocástico, lo cual constituye uno de los principales obstáculos para el estudio y posterior utilización terapéutica de las iPSC. La eficiencia de transformación de células adultas somáticas a iPSC es muy baja y solo una pequeña fracción de las células somáticas adultas puede ser reprogramada a iPSC con los métodos que existen actualmente. Además las iPSC presentan riesgos adicionales relacionados con la formación de tumores malignos, como ocurre también con las células ESC (Li et al., 2008). Algunos de los factores de transcripción transducidos son oncogenes que inducen tumores en los ratones quimera y su descendencia derivados de las iPSC (Okita et al., 2007). Los retrovirus además pueden causar mutaciones al integrarse en el genoma de forma aleatoria, activando o inactivando genes críticos de la célula hospedadora y la

expresión de los transgenes, ya sea por su reactivación o por un insuficiente silenciamiento, puede inhibir la diferenciación de las iPSC *in vivo* aumentando el riesgo de progresión tumoral (Yamanaka, 2009). Estos obstáculos han constituido la mayor preocupación de la comunidad científica para el uso de las iPSC en Medicina Regenerativa. Sin embargo, la tecnología en el desarrollo de la derivación de iPSC ha avanzado rápidamente y desde su descubrimiento han surgido distintas estrategias para aumentar la eficiencia de reprogramación de las iPSC a partir de diversos tipos celulares y para prescindir tanto de oncogenes como del uso de retrovirus.

Además de los fibroblastos utilizados en un primer momento, se han obtenido iPSCs de diversos tipos celulares, como queratinocitos (Aasen et al., 2008), células precursoras neuronales (NPC) (Eminli et al., 2008), células de hígado y estómago de ratón (Aoi et al., 2008) células pancreáticas  $\beta$  (Stadtfield et al., 2008), linfocitos (Hanna et al., 2008) o progenitores circulantes de la sangre (Loh et al., 2009). Estos estudios han demostrado el diferente comportamiento de las células frente a la reprogramación hacia iPSCs, tanto por la eficiencia de reprogramación como por los diferentes requerimientos de factores de transcripción transducidos. Así, linfocitos B totalmente diferenciados necesitan, además de los 4 factores de transcripción descritos por Takahashi y Yamanaka, la transfección de C/EBP $\alpha$  o el knockdown de Pax5 (Hanna et al., 2008). Por otro lado, células en un estado menos diferenciado como las NPCs pueden transformarse en iPSCs sin necesidad de Sox2 exógeno (Eminli et al., 2008) e incluso con la transfección de Oct4 en solitario (Kim et al., 2009). En cuanto a la eficiencia de reprogramación, está ligada tanto a la célula de origen como a las técnicas utilizadas, cubriendo un amplio margen desde el 0,02% descrito inicialmente para fibroblastos humanos (Takahashi et al., 2007), hasta el 24% obtenido para progenitores mieloides de ratón utilizando los mismos 4 genes (Eminli et al., 2009). Además, la utilización de células circulantes o queratinocitos permite prescindir de biopsias para la obtención de las células del paciente. Desde el punto de vista metodológico, también se han logrado grandes avances en la derivación de las iPSCs, permitiendo la sustitución de oncogenes y retrovirus. Por ejemplo, se vio que el oncogén c-Myc era prescindible aunque disminuyera la eficiencia de reprogramación (Nakagawa et al., 2008) y que Klf4 puede reemplazarse por Esrrb (Feng et al., 2009) y Oct4 por Nr5a2 (Heng et al., 2010). También se ha conseguido reemplazar los retrovirus por vectores adenovirales (Stadtfield et al., 2008), plásmidos de expresión (Okita et al., 2008), vectores episomales (Yu et al., 2009) o incluso proteínas recombinantes (Zhou et al., 2009). Estos métodos eliminan los problemas relacionados con la integración de genes exógenos en el genoma pero como contrapartida, son mucho menos eficientes (Okita et al., 2011). También se han utilizado diferentes productos químicos y micro-RNAs, tales como miR-291-3p, miR-294 o miR-295 (Judson et al., 2009) que permiten aumentar la eficiencia de reprogramación y sustituir la transfección de factores de transcripción. Descubrir el método óptimo de reprogramación celular, en el cual la eficiencia sea mayor y los efectos genéticos secundarios sean mínimos, constituye un reto actual para la comunidad científica que trabaja en la tecnología de las iPSC, con el fin de superar así las limitaciones actuales que constituyen el principal obstáculo para la aplicación clínica de estas

células.

### 1.2.2. Células madre de Epiblasto

En estadio de blastocisto, cuando la ICM y el trofoectodermo se han establecido, la ICM forma dos capas embrionarias: el hipoblasto que dará lugar a estructuras extraembrionarias, como el saco vitelino y el epiblasto que formará el embrión propiamente. Por tanto las células del epiblasto siguen siendo pluripotentes y como tales expresan marcadores típicos de pluripotencia como SSEA (Muramatsu y Muramatsu., 2004), Oct4 y Nanog (Hay et al., 2004). Mientras que la mayoría de las células de epiblasto se diferencian hacia distintos tipos celulares somáticos, unas pocas células inician el programa de la línea germinal, reprimiendo el programa somático para dar lugar a los precursores de las células germinales primordiales. Este proceso incluye la re-expresión de marcadores de pluripotencia como Nanog y Sox2 y el borrado de la memoria epigenética del programa somático (Yamaguchi et al., 2005; Yabuta et al., 2006).

Las Células Madre del Epiblasto (EpiSCs) se derivaron recientemente por primera vez del epiblasto temprano de embriones postimplantacionales de ratón de 5.5 a 6.5 *d.p.c.* (*days post coitum*) (Tesar et al., 2007; Brons et al., 2007). Como las ESC humanas y de ratón, las EpiSCs expresan conocidos factores de transcripción que regulan la pluripotencia tales como Oct4, Nanog y Sox2, mantienen su integridad genómica y se diferencian *in vitro* a la mayoría de los tipos celulares somáticos de las tres hojas embrionarias así como a células germinales. Aunque las EpiSCs pueden formar teratomas, presentan sin embargo una capacidad muy limitada de contribuir a quimeras (Tesar et al., 2007). Existen además otras diferencias con respecto a las ESC, como la expresión de Oct4 dependiente del *enhancer* proximal en lugar del *enhancer* distal (Tesar et al., 2007) o la relativa baja expresión de otros factores de pluripotencia esenciales para la mESC, tales como Klf4 y Stella (Tesar et al., 2007; Nichols y Smith, 2009) lo que sugiere diferencias fundamentales en los mecanismos que mantienen la pluripotencia en ESCs y EpiSCs (Tesar et al., 2007; Pauklin et al., 2011). Además las EpiSCs poseen características típicas de las células de epiblasto, como la inactivación del cromosoma X en líneas de células femeninas (Chuva de Sousa Lopes et al., 2008) indicando que las EpiSCs se encuentran en un estadio de desarrollo embrionario más avanzado que las ESC.

Un hecho interesante constituye el que las EpiSCs de ratón son más similares a las células ESC humanas que a las ESC de ratón, compartiendo con las primeras los requerimientos para su mantenimiento en cultivo, así como características fenotípicas de las colonias (Brons et al., 2007). Los patrones de expresión génica, la regulación epigenética (Rugg-Gunn et al., 2007) o la biología de la telomerasa son también más parecidos entre EpiSC y ESC humanas que con ESC de ratón (Forsyth et al., 2002; Tesar et al., 2007). Las células ESC humanas y las EpiSCs de ratón dependen de la vía de señalización activin/Nodal y bFGF para mantener su pluripotencia mientras que las células ESC de ratón requieren LIF y BMP como se ha descrito anteriormente. La inhibición de activin/Nodal resulta

en la pérdida de la expresión de Nanog y la consiguiente inducción de diferenciación (Vallier et al., 2009). En las ESC humanas, la vía de señalización de activin/Nodal no es suficiente para mantenerlas en un estado indiferenciado, también bFGF es necesario para mantener la expresión de marcadores de pluripotencia y para inhibir la apoptosis celular en hESC. Tanto las EpiSCs como las ESC humanas muestran un alto nivel de expresión de genes asociados a epiblasto y a la línea germinal temprana como FGF5, Otx2, Eomes, Foxa2 y Brachyury T (Tesar et al., 2007). Esta expresión génica similar sugiere que las EpiSCs de ratón son más parecidas a las ESC humanas que las propias ESC de ratón y que por tanto las ESC humanas se encuentran en un estado más diferenciado que las ESC de ratón.

## **2. Células Germinales Embrionarias**

### **2.1. Origen de las Células Germinales Embrionarias**

Las células germinales embrionarias se derivan de las células germinales primordiales en mamíferos (primordial germ cells, PGCs). Las PGCs son los precursores embrionarios de los gametos adultos masculinos y femeninos de los cuales emergen todos los organismos que se reproducen sexualmente. *In vivo*, las células germinales adquieren totipotencia tras la fertilización. Por tanto una de las características más fascinantes de estas células es su doble naturaleza por un lado de células unipotentes altamente diferenciadas y por otro de células con capacidad de legar su totipotencia latente a los gametos. En el embrión de ratón poco antes de la gastrulación, un primer grupo de unas 50 PGCs pueden detectarse por su alta actividad fosfatasa alcalina no específica de tejido (TNAP) en torno a 7-7.25 *d.p.c.* en el mesodermo extraembrionario en la base del pliegue amniótico (Ginsburg et al., 1990). Experimentos iniciales con ratones quimera mostraron que las PGCs derivan de la parte posterior del epiblasto (Gardner, 1985). Más tarde, siguiendo el destino de células individuales de epiblasto inyectadas con un marcador de linaje, Lawson y Hage (1994) fueron capaces de localizar la población ancestral localizándolas entre las células más proximales del epiblasto adyacentes al ectodermo extraembrionario. El trasplante de células de epiblasto reveló que incluso las células más distales del epiblasto, las cuales normalmente dan lugar a neuroectodermo, tienen la capacidad de formar PGCs cuando son trasplantadas en la región proximal (Tam y Zhou, 1996). Experimentos adicionales basados en el cultivo *ex vivo* de células de epiblasto diseccionadas confirmaron la necesidad de interacción con tejidos extraembrionarios para la formación de las PGCs. Los resultados de estos experimentos mostraron que sólo las células de epiblasto co-cultivadas con tejidos adyacentes extraembrionarios son capaces de formar PGCs (Yoshimizu et al., 2001). Así, la localización de las células y su cercanía a las señales producidas en el ectodermo extraembrionario están implicados en la determinación de las células germinales más que cualquier segregación de determinantes citoplasmáticos preformados (como ocurre por ejemplo en *D. melanogaster*). El proceso de determinación de PGCs está probablemente conectado a la expresión de BMP4. La expresión de esta



proteína está confinada al ectodermo extraembrionario previo a la gastrulación y además embriones homocigotos *knockout* para BMP4 son incapaces de formar PGCs (Lawson et al., 1999).

La adquisición del estatus de células germinales implica una secuencia de eventos de diferenciación, los cuales incluyen cambios drásticos en su estado epigenético (Saitou, 2009) y la supresión génica. Durante este periodo embrionario las PGCs suprimen el programa somático, el cual incluye la represión del grupo de genes *Hox*, reactivan la expresión del gen *Sox2*, el cual podría estar implicado en la recuperación del potencial de pluripotencia y comienza una remodelación epigenética en todo el genoma, la cual incluye el aumento de los marcadores de metilación de histonas H3K27me3 y H3K4me3 (Seki et al., 2005) y la desmetilación del DNA. Además existe un proceso adicional de borrado de la impronta genética y la reactivación del cromosoma X (Sasaki y Matsui, 2008).

Este periodo se caracteriza también por una marcada reducción en la tasa de proliferación de las PGCs (Lawson y Hage, 1994). De un tiempo de duplicación original de 7 horas la proliferación se ralentiza a un tiempo de duplicación de 16-17 horas, esta tasa es mantenida de forma constante durante los siguientes 6 días (Tam y Snow, 1981). Las PGCs además de por la actividad TNAP pueden identificarse por la expresión en su superficie celular de varios marcadores de membrana como SSEA1 y Mvh, los cuales se han usado ampliamente como marcadores de PGCs y proteínas intracelulares como Stella, Fragilis, Nanog y Blimp1 entre otros (De Felici, 2009). Al mismo tiempo, el gen *Oct4*, responsable de la represión de genes de diferenciación (Pesce et al., 1998) comienza a transcribirse siendo regulado por un *enhancer* distal específico de las células germinales (Schöler et al., 1990; Yeom et al., 1996).

## **2.2. Migración de las células germinales primordiales y colonización de las crestas genitales embrionarias**

Hacia el final del estadio de gastrulación (en torno a los 8.0 *d.p.c*) en el ratón, el endodermo visceral posterior da lugar al intestino posterior llevando consigo al grupo de PGCs y distribuyéndolas a lo largo de él. Posteriormente, en torno a los 9.5 *d.p.c* las PGCs migran activamente del epitelio del intestino posterior a lo largo del mesenterio dorsal hasta alcanzar las crestas gonadales (10.5–11.5 *d.p.c*) (Figura 1). Durante la migración activa de las PGCs los procesos de proliferación, supervivencia y motilidad son controlados por vías de señalización celular, aunque estos procesos celulares y moleculares son poco conocidos, una de las vías de señalización conocidas implicadas en estos procesos es la vía c-Kit/Stem Cell Factor. Además se ha demostrado que las PGCs interactúan con diversas proteínas de la matriz extracelular, como la interacción con laminina (García-Castro et al., 1997) e integrinas B1 (Anderson et al., 1999) y que la citoquina SDF-1 y su receptor CXCR4 juegan un papel crucial en los pasos finales de la migración de las PGCs.

Las células germinales de ratón entran en la región de la aorta-gónada-mesonefros (AGM) y terminan su migración cuando alcanzan las crestas genitales en desarrollo en torno a los 10.5 –11.5

*d.p.c.*. Una vez dentro de las crestas gonadales las células germinales comienzan a dividirse por mitosis de forma sincrónica (Pepling y Spradling, 1998). Las diferencias específicas de sexo aparecen en torno a los 12.5 *d.p.c.*, cuando las crestas genitales cambian morfológicamente. Tiene lugar la aparición de las células de Sertoli en las crestas genitales masculinas mientras que en los embriones femeninos las células de soporte se diferencian en células de la granulosa (McLaren, 2000). Un día más tarde, en 13.5 *d.p.c.* las células germinales en los machos sufren parada mitótica, mientras que las PGCs de hembras entran en profase meiótica y se detienen en diplotene hasta el momento del nacimiento (Peters, 1970). Estas PGCs tardías (12.5-13.5 *d.p.c.*) pierden su capacidad de formar EGCs pluripotentes cuando son aisladas y cultivadas bajo determinadas condiciones *in vitro*.

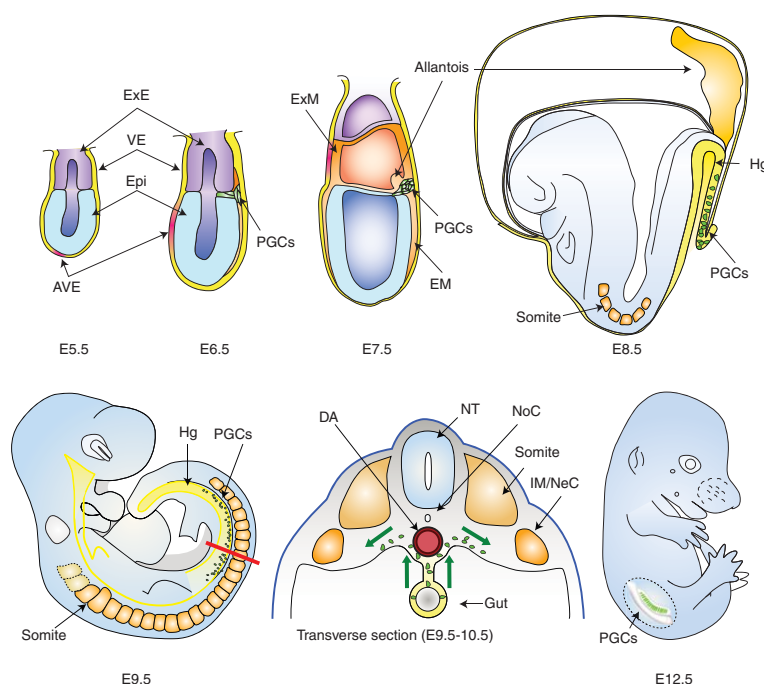


Figura 1: Representación esquemática de los procesos de especificación, migración y colonización de las gónadas de las PGCs (verde) durante el desarrollo embrionario de ratón. Se muestran cortes longitudinales desde los estadios 5.5 a 12.5 *d.p.c.* y un corte adicional transversal de 9.5 *d.p.c.* que señala por flechas de color verde el esquema de migración de las PGCs. Epi: epiblasto; AVE: endodermo anterior visceral; ExE: ectodermo extraembrionario; EM: mesodermo embrionario; ExM: mesodermo extraembrionario; Hg: intestino posterior; DA: aorta dorsal; NT: tubo neural; NoC: notocorda; IM: mesodermo intermedio; NeC: cordón nefrogénico; Allantois: alantoides; Somite: somita. (Esquema extraído de Saitou y Yamaji, 2012).

### 2.3. Células Germinales Embrionarias y células de Carcinoma Embrionario

Históricamente, se ha descrito que las PGCs pueden dar lugar a dos tipos de células madre pluripotentes. *In vivo*, las PGCs pueden generar células de carcinoma embrionario (ECC), las células madre pluripotentes de los tumores testiculares (Stevens, 1967; Oosterhuis y Looijenga, 2005). Las líneas celulares de carcinoma embrionario pueden ser derivadas de teratocarcinomas espontáneos en el

adulto o de tumores producidos por el trasplante de blastocistos o de las crestas gonadales en sitios ectópicos, como la capsula de riñón de ratones adultos. Las ECC muestran similitudes morfológicas y comparten los mismos marcadores de pluripotencia con las otras células madre pluripotentes, sin embargo suelen presentar aneuploidía por lo que no contribuyen a la línea germinal cuando se inyectan en blastocistos (Rossant y Papaioannou, 1984). Poseen igual que las ESC, la capacidad de proliferar indefinidamente en estado indiferenciado y retienen la capacidad para diferenciarse a distintos tejidos. Cuando las ECC son inyectadas en blastocistos de ratón pueden contribuir a la formación de tejidos en animales quimera (Brinster, 1974) o en algunos casos a la formación de tumores (Rossant y Mcburney, 1982).

*In vitro*, las PGCs pueden generar otro tipo de células pluripotentes, las células germinales embrionarias (EGC) (Matsui, et al., 1992; Resnick et al., 1992; De Miguel et al., 2002; Surani et al., 2007; De Felici et al., 2009; De Miguel et al., 2010). Las PGCs pueden aislarse y cultivarse durante cortos periodos de tiempo (hasta los 7-10 días) manteniendo su fenotipo hasta que desaparecen bien porque comienzan a sufrir apoptosis o porque se diferencian (De Miguel y Donovan, 2003). Las PGCs de estadios embrionarios comprendidos entre 8.5 *d.p.c.* hasta 12.5 *d.p.c.* se usan prevalentemente para la derivación a líneas de EGCs. El cultivo *in vitro* de PGCs ha permitido identificar varios factores de crecimiento que afectan a su supervivencia y/o proliferación. Cuando las PGCs se exponen en cultivo a la mezcla específica de factores de crecimiento LIF, bFGF, SCF y suero se immortalizan y forman células pluripotentes EGCs través de un mecanismo de reprogramación molecular (Matsui et al., 1992; Resnick et al., 1992; Durcova-Hills et al., 2001). Estas células son similares en términos de morfología celular y de perfil de expresión génica a las ESCs derivadas de la ICM o de las iPSC generadas a partir de células diferenciadas (Sharova et al., 2007; Durcova-Hills et al., 2008). Las células EGCs de ratón comparten muchas de las características de pluripotencia, como la habilidad para diferenciarse a tejidos de las tres hojas embrionarias *in vitro*, la contribución a la línea germinal en la generación de ratones quimera cuando se introducen en blastocistos y la capacidad de formar teratomas (Matsui et al., 1992; Labosky et al., 1994; Stewart et al., 1994). A diferencia de las PGCs, las EGCs crecen de forma continua en cultivo, son capaces de subcultivo y forman colonias. Estas células expresan los marcadores de pluripotencia Oct4, Sox-2, Nanog y STAT3. Sin embargo las células EGCs difieren de las iPSC y de las ESC en algunas propiedades. Las células EGCs poseen un diferente estado epigenético por el borrado de la impronta genética en los futuros gametos, un proceso que ocurre poco después de la especificación de las PGCs en el cual se remodela la cromatina de ciertos genes de la impronta como Igf2, Igf2rr, Dlk1 y H19 (Lee et al., 2002). Por tanto, el estado de pluripotencia de las EGC es en cierta medida diferente del estado de pluripotencia inicial de las ESC (Gillich y Hayashi, 2011). Aunque los descubrimientos a este respecto están aumentando, el mecanismo molecular y epigenético que controla la reprogramación de las unipotentes PGCs en células pluripotentes EGCs aún no se conoce del todo. Sin embargo se han identificado vías de señalización y genes que controlan algunos procesos como la proliferación y especificación de las PGCs y la restricción epigenética que

separa las PGCs de la pluripotencia. Algunas líneas de investigación han identificado moléculas clave implicadas en la adquisición de pluripotencia de las PGCs. Se ha propuesto que la subregulación de *Prdm1/Blimp1* es prerequisite para la derivación a células EGCs (Durcova-Hills et al., 2008) y la inactivación del gen supresor de tumores PTEN aumenta la producción de células EGCs y la formación de teratomas testiculares (Kimura et al., 2003). Una activación forzada de Akt, uno de los efectores “downstream” de PI3K y regulado por PTEN aumenta la eficiencia de derivación de EGCs y permite la obtención de éstas a partir de PGCs tardías en el desarrollo embrionario (14.5 *d.p.c.*) (Kimura et al., 2008; Gillich y Hayashi, 2011).

Las primeras EGCs se derivaron en ratón (Matsui et al., 1992.; Resnick et al., 1992) más tarde se consiguieron en una variedad mamíferos como vaca (Cherny et al., 1994), cabra (Jia et al., 2008), cerdo (Shim et al., 1997) y oveja (Ledda et al., 2010) entre otros. De forma más importante en 1998 Gearhart y colaboradores consiguieron derivar las primera línea EGCs humanas (Shamblott et al., 1998), proporcionando una potencial fuente para la terapia con células madre pluripotentes (De Miguel et al., 2011).

#### **2.4. Células Germinales embrionarias como modelo de estudio de reprogramación celular**

Las EGCs constituyen una fuente importante de células para la terapia con células madre y un valioso modelo para la comprensión de procesos implicados en la reprogramación celular tal como la adquisición de pluripotencialidad. Para entender los mecanismos que subyacen a la adquisición de pluripotencialidad, es crítico identificar células que se puedan convertir a células madre pluripotentes. Como se ha mencionado anteriormente, investigadores han demostrado que células que se encuentran en un estado más primitivo resultan mas fáciles de reprogramar, como las NPC (Eminli et al., 2008) o progenitores circulantes de la sangre (Loh et al., 2009). En este sentido, el uso de PGCs, las cuales ya expresan Oct4, Sox2 y Nanog (factores necesarios en la reprogramación celular) para la derivación a EGCs constituye un importante modelo de estudio de los mecanismos de inducción de pluripotencia. Sorprendentemente, la expresión por parte de las PGCs de dichos factores necesarios para la reprogramación celular en iPSC, no hacen de ellas células madre pluripotentes per se, lo que podría ser explicado por la variación en sus niveles específicos de expresión o bien conduce a pensar que deben existir otras formas de reprogramar células que no los impliquen. El estudio de los mecanismos moleculares que llevan a la conversión de PGCs en células pluripotentes EGCs constituye una herramienta útil e interesante para encontrar nuevos factores y vías alternativas para la reprogramación celular. Además, la relativa facilidad técnica con la que las PGCs pueden ser reprogramadas con una mezcla específica de factores de crecimiento sin necesidad de manipularlas genéticamente o de utilizar factores de reprogramación exógenos, las convierte en objetos de estudio ideales para comprender la potencialidad y plasticidad celular.

La acción combinada de los factores de crecimiento LIF y SCF es necesaria para la supervivencia y proliferación de PGCs en cultivo, pero sólo la combinación de los anteriores factores con el factor bFGF parece ser necesaria y suficiente para la reprogramación de PGCs en EGCs (Matsui et al., 1992; Resnick et al., 1992). Por tanto el principal inductor de la reprogramación de PGCs de ratón y humanas a EGCs parece ser el factor bFGF (Figura 2). El mecanismo por el cual el tratamiento con bFGF provoca esta reprogramación, aún no ha sido totalmente esclarecido. Recientes investigaciones parecen relacionar a este factor con la subregulación del regulador transcripcional específico de linaje germinal Blimp1 (Durcova-Hills et al., 2008, De Felici et al., 2009) y la sobreexpresión de dos de los factores clave en la inducción de pluripotencialidad, Klf4 y c-Myc (Durcova-Hills et al., 2008) los cuales son los únicos factores utilizados originalmente para la derivación de iPSC que no son expresados de forma natural por las PGC.

El mayor inconveniente en la utilización de PGC como modelo de estudio es el escaso número de células disponibles en el momento del desarrollo en el que la reprogramación es más eficiente, esto es, entre 50 y 100 células por embrión de ratón a los 8.5 *d.p.c.*, lo que requiere un gran número de embriones de ratón sincronizados para realizar cada experimento (McLaren, 2003). Esto, unido a la imposibilidad de expandir *in vitro* la población de PGCs al sobrevivir poco más de una semana en cultivo, dificulta la realización de técnicas en las que se requiere un gran volumen de células.

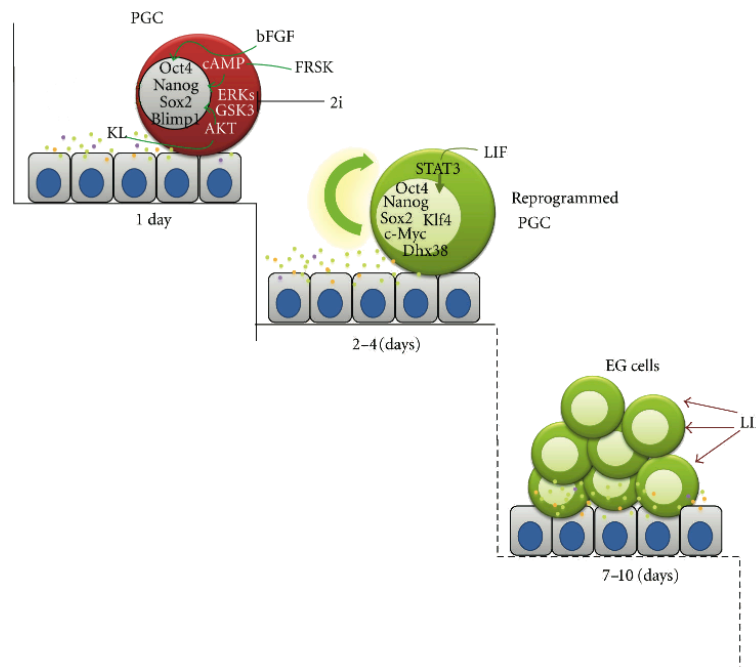


Figura 2: Representación esquemática del proceso de reprogramación de PGCs a EGCs donde se indican los factores y vías de señalización intracelular implicados en el proceso. (Esquema extraído y modificado de De Felici, 2011).

### 3. Hipoxia

Los organismos aeróbicos requieren oxígeno ( $O_2$ ) para producir energía. El  $O_2$  es un nutriente esencial que sirve como sustrato clave en el metabolismo celular y la bioenergética. La producción de energía eficiente se mantiene por fosforilación oxidativa en la mitocondria, donde la glucosa actúa como sustrato y el  $O_2$  como aceptor final de electrones. El nivel de  $O_2$  en el aire es aproximadamente del 21%, condición denominada normoxia, aunque realmente muy pocas partes del cuerpo están expuestas a esta concentración tan elevada de  $O_2$ . Es difícil definir la hipoxia con un valor umbral de concentración específica de oxígeno. De acuerdo con algunas definiciones, la hipoxia se produce cuando los niveles de oxígeno alcanzados se encuentran por debajo de aquéllos que alteran las funciones biológicas. Este nivel puede variar entre los diferentes tipos celulares, aunque normalmente un valor de corte de uso general en experimentación se encuentra por debajo del 5% de  $O_2$  (Hockel y Vaupel, 2001; Brahimi-Horn et al., 2007). En multitud de estados fisiológicos y patológicos podemos encontrar una disminución en los niveles de  $O_2$  o hipoxia, como ocurre durante el desarrollo embrionario o en enfermedades tales como la anemia, las enfermedades cardiovasculares o el cáncer (Brahimi-Horn et al., 2007).

#### 3.1. Factores inducidos por Hipoxia

Los tejidos y las células expuestas a hipoxia responden a ella mediante la activación de moduladores clave denominados factores inducidos por hipoxia (HIFs). Los HIFs son factores de transcripción heterodiméricos compuestos de dos subunidades con dominios de estructura de tipo hélice-lazo-hélice (HLH), la subunidad  $\alpha$  y la subunidad  $\beta$ . Existen tres isoformas de la subunidad  $\alpha$  conocidas, HIF-1 $\alpha$ , (Semenza et al., 1992; Wang et al., 1995; Wang y Semenza, 1995) HIF-2 $\alpha$  (Tian et al., 1997; Wiesener et al., 1998) y HIF-3 $\alpha$  (Makino, et al., 2001). HIF-1 $\alpha$  y HIF-2 $\alpha$  forman un heterodímero con la misma subunidad  $\beta$ , denominada HIF-1 $\beta$  (o ARNT) a través de sus dominios HLH y PAS. La otra isoforma, HIF-3 $\alpha$ , está menos caracterizada que las anteriores, se cree que no es muy activa transcripcionalmente y que en algunos casos funciona como regulador negativo de las otras subunidades  $\alpha$ . HIF-1 $\alpha$  se expresa de forma ubicua en todas las células, mientras que HIF-2 $\alpha$  y HIF-3 $\alpha$  restringen su expresión a determinados tejidos. Se ha detectado expresión de HIF-2 $\alpha$  en células de endotelio vascular, parénquima de hígado, neumocitos, células epiteliales de riñón, así como en estadios embrionarios tempranos. HIF-3 $\alpha$  se expresa en timo, células de Purkinje y epitelio corneal (Bertout et al., 2008). La subunidad HIF-1 $\beta$  se expresa de forma constitutiva, mientras que los niveles de las subunidades HIF- $\alpha$  están regulados a nivel post-transcripcional por los niveles de oxígeno. El dominio N-terminal de las subunidades  $\alpha$  contiene un dominio de degradación dependiente de oxígeno (ODD). Cuando el oxígeno está disponible, residuos de prolina conservados del dominio ODD son hidroxilados por las enzimas prolin hidroxilasas (PHDs). La hidroxilación lleva al reconocimiento de la

subunidad  $\alpha$  por el complejo E3 ubiquitin ligasa Von Hippel-Lindau (VHL) y conduce a su ubiquitinación y posterior degradación por el proteasoma (Huang et al., 1998; Kallio et al., 1999; Ivan et al., 2001; Jaakkola et al., 2001). Además, el factor inhibidor FIH1 (Factor inhibiting HIF 1) hidroxila también un residuo de asparagina en el dominio de transactivación de la subunidad  $\alpha$ , lo cual interfiere con la función transcripcional de HIF-1 (Lando et al., 2002). De esta forma la actividad de HIF es inhibida de forma muy eficiente cuando hay oxígeno disponible en el ambiente. Sin embargo, cuando la concentración de oxígeno disminuye la hidroxilación es inhibida, lo que conduce a la acumulación de las subunidades HIF- $\alpha$ , las cuales pueden formar dímeros con HIF-1 $\beta$ , reclutar coactivadores (p300/CBP) y activar la transcripción génica dependiente de HIF uniéndose a los elementos de respuesta a hipoxia (HRE) en las regiones promotoras de los genes diana (Figura 3). Los HREs son motivos similares a los Enhancer box (E-box) y poseen la secuencia consenso G/ACGTG.

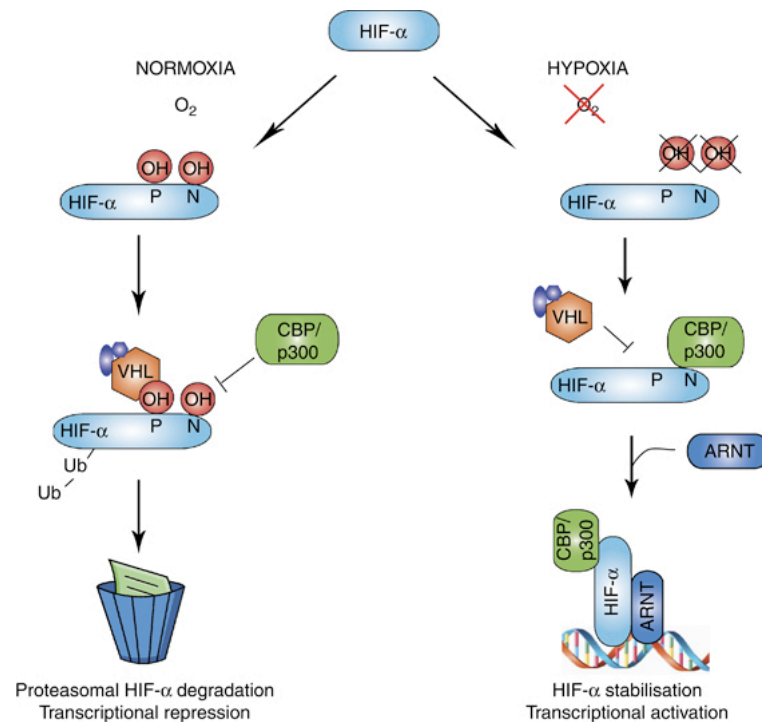


Figura 3: Regulación post-transcripcional de HIF- $\alpha$  dependiente de oxígeno. (Esquema extraído de Martin et al., 2011).

Además de la regulación de HIF por la disponibilidad de oxígeno, existen otras vías de activación de HIF bajo condiciones de normoxia y parece que los mecanismos que regulan la actividad de HIF bajo condiciones de normoxia e hipoxia difieren. Algunas de estas vías conocidas incluyen la vía de señalización de las MAPK y PI3K (Semenza, 2003) o la regulación por el factor de crecimiento SCF. De hecho se ha demostrado que SCF, uno de los factores necesarios para la reprogramación de PGCs a EGCs, aumenta los niveles de HIF-1 $\alpha$  y HIF-2 $\alpha$  en normoxia en células hematopoyéticas y que dicha inducción ocurre a través de mecanismos dependientes de las vías de señalización de PI3K y

Ras/MEK/Erk (Pedersen et al., 2008).

Los HIFs regulan una gran cantidad de genes implicados en la respuesta adaptativa de las células y los tejidos a la baja concentración de oxígeno tanto de forma sistémica como local. Una respuesta a una hipoxia sistémica causada por la pérdida de sangre o por altitud induce un aumento en los niveles de la hormona EPO en el riñón (Semenza y Wang, 1992). Los niveles elevados de EPO aumentan la producción de eritrocitos para incrementar la eficiencia en el reparto de oxígeno a los órganos. A nivel tisular, la hipoxia puede ser contrarrestada por la inducción de vascularización y angiogénesis. De esta forma, HIF conduce esta respuesta sobreexpresando genes como el factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGFA) y las angiopoietinas 1 y 2 (ANGPT1, ANGPT2) (Simon et al., 2008) que median el reclutamiento, el crecimiento y la diferenciación de células vasculares endoteliales y musculares lisas para incrementar el suministro vascular.

A nivel celular, para la identificación de genes regulados por HIF-1 $\alpha$  y HIF-2 $\alpha$ , se han llevado a cabo varios estudios en los cuales se ha medido la expresión génica inducida por hipoxia en ausencia de una de las unidades de HIF- $\alpha$ . Parece que la subunidad HIF-1 $\alpha$  es la que juega un mayor papel en la inducción de genes en respuesta a la hipoxia. Aunque existen genes diana cuya regulación es común a ambas subunidades HIF- $\alpha$ , como por ejemplo genes de la vía glucolítica, existen otros que son regulados exclusivamente por HIF-1 $\alpha$  o HIF-2 $\alpha$  (Hu et al., 2003; Sowter et al., 2003; Hu et al., 2006; Covello et al., 2006). Entre los más de 150 genes diana regulados por HIFs se encuentran varios relacionados con la potencialidad celular, como Notch y ETS-1 regulados por HIF-1 $\alpha$  (Oikawa et al., 2001; Gustafsson et al., 2005) y Oct4 y c-Myc regulados por HIF-2 $\alpha$ , los cuales como se ha mencionado anteriormente son elementos de gran importancia en la red transcripcional responsable del estado de célula madre (Covello et al., 2006; Gordan et al., 2007a). Notch es un receptor transmembrana que inhibe la diferenciación de varios tipos celulares como las células madre hematopoyéticas (Pear y Aster, 2004) y ETS-1 regula a su vez numerosos genes y está relacionado con el desarrollo de las células madre, la progresión tumoral, la senescencia y la muerte celular (Dwyer et al., 2007). También se ha descrito la regulación de la expresión de TERT (Transcriptasa Inversa de la Telomerasa) proteína responsable de la actividad telomerasa que es imprescindible para la autorrenovación de las células madre por HIF-1 $\alpha$  (Nishi et al., 2004).

Se sabe que HIF-1 $\alpha$  es expresado ampliamente durante el desarrollo embrionario, mientras que se ha demostrado que HIF-2 $\alpha$  un tiene patrón de expresión más restringido en estadios embrionarios tempranos, los cuales incluyen blastocisto, embriones de 7.5 *d.p.c.* y células germinales primordiales (Jain et al., 1998; Covello et al., 2006). Ratones *KO* para HIF-1 $\alpha$  son letales embrionarios a día 11 en el desarrollo debido a la falta de vascularización, defectos en el tubo neural y malformaciones cardiovasculares (Ryan et al., 1998; Iyer et al., 1998). La mayoría de las cepas de ratones *KO* para HIF-2 $\alpha$  son también letales embrionarios, pero dependiendo del “background” de la raza algunos de ellos sí llegan a nacer. Algunos de los defectos que muestran estos ratones *KO* para HIF-2 $\alpha$  incluyen daños en la placenta, alteración en la regulación de la frecuencia cardíaca y defectos en la



remodelación vascular y desarrollo pulmonar asociados a la falta de VEGFA (Tian et al., 1998; Peng et al., 2000). Ratones *KO* para ARNT también son letales embrionarios a día 10.5 del desarrollo. Los embriones muestran una angiogénesis defectuosa en el saco vitelino y defectos de cierre del tubo neural (Kozak et al., 1997; Maltepe et al., 1997). Se ha visto también que HIF tiene un efecto directo sobre las PGC, ya que la pérdida de HIF-2 $\alpha$  supone una reducción drástica de su número en embriones de ratón, por lo que HIF-2 $\alpha$  parece ejercer un papel crítico en la especificación y/o supervivencia de las PGCs en ratón (Covello et al., 2006). Los resultados de todos estos estudios de pérdida de función en ratón han demostrado que las subunidades HIFs son esenciales para un normal desarrollo embrionario.

### 3.2. Hipoxia y células madre

Durante la embriogénesis temprana en mamíferos antes de la aparición del sistema circulatorio, el transporte de oxígeno dentro del embrión ocurre a través de difusión, la cual está limitada a 150  $\mu$ m, por tanto el desarrollo embrionario ocurre a concentraciones bajas de oxígeno, las cuales oscilan entre 1.5 a 5.3% (Ezashi et al., 2005). También en el organismo adulto existe una baja concentración de oxígeno similar en la médula ósea, donde se encuentran las células madre hematopoyéticas y mesenquimales (Cipolleschi et al., 1993).

En este microambiente hipóxico se crean nichos específicos de células madre, los cuales constituyen un ambiente adecuado para el mantenimiento del estado indiferenciado y de la regulación de la diferenciación de las células madre (Moore y Lemischka, 2006) además de una posible protección frente a daños potenciales causados por el oxígeno (Diabira y Morandi, 2008). Esto sugiere que la concentración ambiental de oxígeno parece estar relacionada con el desarrollo y mantenimiento de las células madre pluripotentes.

Ya en 1978, los investigadores Quinn y Harlow determinaron que la tensión óptima de oxígeno para el desarrollo *in vitro* de embriones de ratón desde un estadio preimplantacional hasta blastocisto oscilaba entre 2,5% y 5%. Demostraron además que blastocistos desarrollados bajo condiciones de normoxia poseían menor número de blastómeros que los desarrollados en hipoxia (Quinn y Harlow, 1978). Posteriormente, algunos autores plantearon la hipótesis de que dado que los embriones concebidos de forma natural están expuestos a bajas concentraciones de oxígeno y que éstos son muy sensibles al daño oxidativo en el ADN celular (Keith y Simon, 2007) la hipoxia podría favorecer el mantenimiento del cultivo *in vitro* de células ESC. Ezashi y colaboradores (2005) fueron los primeros en demostrar que colonias de hESC mantenidas en un ambiente hipóxico mostraban una reducción significativa de la cantidad de diferenciación celular espontánea que ocurre normalmente en colonias de hESC cultivadas en normoxia. Esto demostró que bajas concentraciones de oxígeno prevenían la diferenciación de células hESC y que probablemente la hipoxia es una condición requerida para mantener a la mayoría de células ESC de una colonia en un estado de completa pluripotencia.

Sorprendentemente, en este mismo estudio los autores demostraron que dichas hESC cultivadas en hipoxia al ser sometidas a un protocolo de diferenciación veían incrementada su capacidad de formar EBs (Ezashi et al, 2005). Se ha observado mediante estudios de análisis de expresión génica en hESC cultivadas en un ambiente hipóxico, que los niveles de expresión de los genes asociados a pluripotencia OCT4, NANOG y SOX2 se mantienen, y que además sobreexpresan otros genes asociados a pluripotencia, como LEFTY2, ENDRB, SALL1, TRIM2, ZIC2, FGFR2, SERPINE1 y KLF11, mientras que genes asociados a diferenciación como HAND1, EOMES, H19, GATA6 y MSX2 muestran mayores niveles de expresión en normoxia (Westfall et al., 2008). De forma similar, posteriormente otros autores observaron que células hESC cultivadas en hipoxia y expuestas posteriormente a normoxia, incrementaban la expresión de marcadores específicos de linaje (Lengner et al., 2010).

La activación de la respuesta a hipoxia por parte de las hESC ha sido validada recientemente en varios estudios en los cuales se ha demostrado que HIF-1 $\alpha$  se expresa en condiciones hipóxicas, pero tras un periodo largo de cultivo en dichas condiciones la expresión de HIF-1 $\alpha$  se pierde, mientras que HIF-2 $\alpha$  y HIF-3 $\alpha$  continúan manteniendo su expresión en el núcleo celular (Forristal et al., 2010). El silenciamiento de HIF-2 $\alpha$  o HIF-3 $\alpha$ , pero no de HIF-1 $\alpha$ , en hipoxia, conduce a una disminución de los niveles de RNA mensajero y proteína de los genes OCT4, SOX2 y NANOG en hESC. Además, células hESC deficientes en HIF-2 $\alpha$  fallan en la proliferación, lo cual impide su mantenimiento en cultivo (Forristal et al., 2010). Estos resultados implican que HIF-1 $\alpha$  es activado en la respuesta inicial a hipoxia pero parece que HIF-2 $\alpha$  es el responsable del mantenimiento de las células hESC a largo plazo en un cultivo hipóxico. De forma muy interesante la hipoxia también incrementa la eficiencia en la generación de iPSC tanto en humano como en ratón (Yoshida et al., 2009). Igualmente, las células madre hematopoyéticas se ven claramente afectadas por la concentración de oxígeno, aumentando su supervivencia y autorrenovación (Danet et al., 2003). Las células madre neuronales y las miogénicas aumentan su proliferación y mantienen su estado pluripotente sin diferenciarse (Gustafsson et al., 2005). Las células madre de neuroblastoma o cáncer de mama conservan un fenotipo más inmaduro en hipoxia (Axelson et al., 2005). Sin embargo, se ha demostrado que en mESC cultivadas bajo condiciones de hipoxia del 1% de oxígeno, se ejerce un efecto inhibitorio de la autorrenovación y promotor de la diferenciación temprana a través del factor HIF-1 $\alpha$  (Jeong et al., 2007). Esto podría ser debido a las diferencias existentes en la vías de señalización que mantienen el estado de pluripotencia de las ESC en ratón y humano e incluso a las condiciones de hipoxia en las que hayan crecido dichas células, ya que variaciones en la tensión de oxígeno conducen a distintas respuestas génicas/celulares.

Sin embargo, a pesar de los estudios publicados que muestran una clara relación entre hipoxia y células madre, ninguno de ellos ha identificado cuáles son los mecanismos moleculares exactos por los cuales la hipoxia altera la regulación de pluripotencia en las ESC.

En trabajos realizados en nuestro laboratorio se estudió el posible efecto de la hipoxia en la reprogramación de las células PGCs a células pluripotentes EGCs de ratón. Los datos obtenidos mostraron que PGCs cultivadas bajo condiciones de hipoxia (3% O<sub>2</sub>) durante al menos 7 días mejoraban significativamente la proliferación de éstas *in vitro*. De forma más importante, se observó que las PGC adquirirían características de célula madre pluripotentes, tales como la formación de colonias (en ausencia del bFGF) y la obtención EBs, los cuales daban lugar a células de las 3 hojas embrionarias. La caracterización de estas células obtenidas bajo dichas condiciones mostró que carecían de autorrenovación ilimitada, y de la expresión de algunos de los factores de pluripotencia claves en la generación de iPSC, tales como c-Myc y Klf4. Estos hechos sugieren que la hipoxia induce una reprogramación parcial de las células PGCs y que éstas se encuentran en un estadio intermedio entre PGCs y EGCs.

### 3.3. Hipoxia y metabolismo celular

Las células en hipoxia necesitan adaptarse a los bajos niveles de oxígeno, para lo cual cambian su metabolismo dependiente de oxígeno. En condiciones de normoxia, el O<sub>2</sub> molecular sirve como aceptor de electrones en la fosforilación oxidativa, la cual tiene lugar en las mitocondrias. Una adaptación clave a la hipoxia es el cambio que se produce en las células hacia formas no oxidativas de metabolismo y producción de ATP, como la glucólisis anaerobia. Esto supone un gran incremento en la demanda de glucosa por parte de la célula (puesto que sólo se producen 2 ATP por molécula de glucosa, mientras que la fosforilación oxidativa produce 36 ATP) así como una bajada del pH intracelular (acidosis microambiental debido a la fermentación láctica) y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) por la mitocondria (Hamanaka et al., 2009). HIF-1 $\alpha$  guía este cambio metabólico promoviendo la expresión de transportadores de glucosa, enzimas glucolíticas y de la enzima lactato deshidrogenasa (LDHA) la cual repone NAD<sup>+</sup> para aumentar más la glucólisis (Gordan et al., 2007b). Además, estudios realizados por los investigadores Kim y Papandreou (2006) han demostrado que la enzima piruvato deshidrogenasa quinasa 1 (PDK1)-codificada por el gen diana de HIF-1 $\alpha$ , *PDK1*- reprime el flujo de piruvato a acetil-CoA, desviando el carbono de la mitocondria y suprimiendo el consumo de O<sub>2</sub> (Simon, 2006). También HIF-2 $\alpha$  parece tener un papel en el metabolismo, promoviendo la homeostasis redox y la viabilidad celular. Scortegagna y colaboradores (2003) demostraron que HIF-2 $\alpha$  estimula la expresión de genes que codifican enzimas antioxidantes, como SOD2, en ratón lo que parece suprimir la acumulación aberrante de ROS en las células, sugiriendo que la limitación de ROS es una importante adaptación metabólica de HIF a bajos niveles de O<sub>2</sub>. Por otro lado, varios estudios demuestran la implicación de los ROS, como segundos mensajeros, en la estabilización y la actividad transcripcional de HIF en células sometidas tanto a condiciones de normoxia como de hipoxia (Pouyssegur y Mechta-Grigoriou, 2006).

Existe además una relación entre el metabolismo glucolítico y la adquisición de características de célula madre, tales como la autorrenovación y capacidad de diferenciación a otros tipos celulares. Esta relación ha sido ampliamente estudiada en el conocido efecto Warburg, según el cual las células cancerosas prescinden de la respiración oxidativa en condiciones de normoxia en las que existe un adecuado suministro de oxígeno y producen energía en el citosol por un proceso de glicólisis anaeróbica seguido de fermentación láctica en vez de producir energía por la vía de oxidación aeróbica del piruvato en las mitocondrias (Warburg et al., 1930). Como las células madre comparten varias características con las células tumorales, son células indiferenciadas y a la vez presentan mucha plasticidad celular y capacidad de diferenciación a distintos tejidos, se pensó en la relación entre el metabolismo glucolítico y la pluripotencialidad (Bartrons y Caro, 2007; Brahimi-Horn et al., 2007). De hecho, se ha observado muy recientemente que en la derivación de iPSC de ratón se produce un cambio metabólico hacia glucólisis poco antes de la adquisición de características de célula madre (Folmes et al., 2011). Además de todo esto, varios de los factores del sistema de transducción de señales de bFGF, como PTEN (Phosphatase and Tensin homolog), Ras o Myc, estimulan la glucólisis frente a la respiración oxidativa (Brahimi-Horn y Pouyssegur, 2007).

Existen pocos datos relativos al metabolismo de las PGCs. Se ha visto que las PGCs premigratorias (7.5 *d.p.c.*) poseen un número muy bajo de mitocondrias (<10) y que éste va aumentando durante su desarrollo (Ramalho-Santos et al., 2009). En un estudio previo a esta Tesis Doctoral, la Dra. De Miguel y otros colaboradores se propusieron identificar genes que podrían inducir la pluripotencialidad en PGCs mediante el uso del modelo clásico de inducción pluripotencialidad a células EGCs anteriormente citado. Se compararon los patrones de expresión génica entre las células unipotentes PGCs y las pluripotentes EGCs y se identificaron 20 genes sobreexpresados en células EGCs con respecto a PGCs. Sorprendentemente entre estos genes no se encontraban los genes tradicionalmente relacionados con pluripotencialidad, como los factores de transcripción usados para la inducción de iPSC. Los genes identificados estaban más relacionados con el metabolismo celular (enolasa1, galactoquinasa2, fosfogliceromutasa1), moléculas específicas de la mitocondria (Mrps31, URpf1), genes relacionados con receptores asociados a proteína G y genes relacionados con la remodelación de la cromatina (Eed, Fkb11, Ascc1). Estos resultados sugirieron la posibilidad de alcanzar la reprogramación celular mediante diferentes vías moleculares y abren la posibilidad teórica de inducir la pluripotencialidad en células diferenciadas manipulando factores externos o el metabolismo celular.

## *Objetivos*

---



## **1. Objetivo principal**

Identificar el papel de la concentración de oxígeno en los mecanismos moleculares que controlan la supervivencia, proliferación e inducción de pluripotencialidad celular en las células germinales primordiales de ratón en un modelo *in vitro* de cultivo bajo condiciones de hipoxia.

## **2. Objetivos secundarios**

**2.1.** Caracterizar fenotípica, transcriptómica y funcionalmente las células germinales primordiales en las que se han inducido características de pluripotencialidad bajo condiciones de hipoxia.

**2.2.** Estudiar la implicación de los principales reguladores de la respuesta celular a hipoxia, HIF's, en procesos de supervivencia, proliferación y adquisición de pluripotencialidad de las células germinales primordiales.

**2.3.** Relacionar la expresión de Oct4, uno de los principales genes implicados en mecanismos de pluripotencialidad y reprogramación celular, en la adquisición de pluripotencialidad de las células germinales primordiales bajo condiciones de hipoxia.

## **Relevancia**

Profundizar en la comprensión del papel de la concentración de oxígeno en la reprogramación de las PGC para dar lugar a células madre pluripotentes como las EGC nos puede proporcionar importantes conocimientos acerca de la inducción de pluripotencialidad, así como del mantenimiento o restricción de la totipotencialidad en la línea germinal. Estos conocimientos podrían aplicarse, no sólo a la obtención de iPSC de forma más eficiente y segura, sino a la mejora en la derivación de otros tipos de células madre pluripotentes, así como a la prevención y tratamiento del cáncer testicular y otros.

## *Materialles y Métodos*

---





## 1. Animales de estudio

Todos los animales utilizados para la realización de esta tesis doctoral estaban incluidos en los protocolos de trabajo del Animalario del Servicio de Cirugía Experimental del Hospital Universitario La Paz (HULP) y fueron aprobados por el comité ético de bienestar animal (CEBA) de dicho hospital en Madrid. El modelo animal usado en los experimentos ha sido el ratón (*Mus musculus*) debido a la facilidad de manejo de la especie, su elevado número de camadas anuales así como su breve periodo de gestación y rápido destete y la similitud biológica con el ser humano. Se han utilizado dos razas de ratón diferentes, en primer lugar se usaron los ratones transgénicos Oct4-GFP pertenecientes a la raza C57BL/6J, la cual constituye una buena raza criadora debido a su alto número de crías por camada y altos niveles de fecundidad.. Estos ratones portan la proteína de fusión de 18 kb EGFP/Oct4 (proteína verde fluorescente) bajo el control del promotor de Oct4 y su elemento de regulación distal, DE (distal enhancer) y proximal, PE (proximal enhancer) asegurando la expresión específica del transgen en la línea germinal (Figura 4). Estos ratones fueron donados por el Dr. Hans R. Schöler del Instituto Max Plank de Medicina Molecular (Yoshimizu et al., 1999).

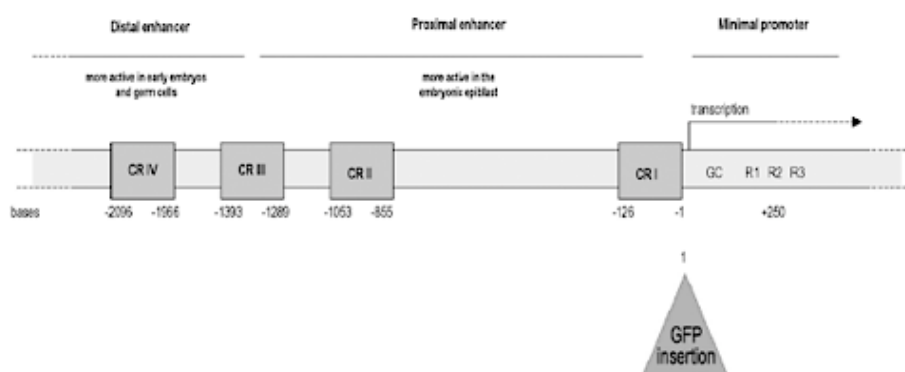


Figura 4: Esquema de la construcción Oct4-GFP transfectada en los ratones utilizados en la realización de los experimentos de esta Tesis. (Dibujo modificado y extraído de Boiani et al., 2004).

En segundo lugar se usaron ratones dobles transgénicos Oct4-GFP/KFP para la obtención de células PGCs usadas en el protocolo de de agregacion a mórulas hospedadoras de ratón. Estos ratones se generaron en nuestro laboratorio a partir del cruce de la línea de ratones transgénicos Oct4-GFP y la línea de ratones transgénicos *Katushka* (Diéguez-Hurtado et al., 2011). Los ratones transgénicos *katushka* provienen del cruce de razas C57BL/6J X CBA/J y expresan de forma ubicua el transgen de la proteína fluorescente katushka (KFP) que emite su fluorescencia en el rojo lejano del espectro. Estos ratones han sido cedidos amablemente por la Dra. Sagrario Ortega del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, Madrid. Para el mismo protocolo de agregación de PGCs a mórulas hospedadoras se usaron hembras CD1 de 3-4 semanas de edad como donantes de embriones y machos

CD1 fértiles de más de 8 semanas de edad, aportados igualmente por la Dra. Sagrario Ortega.

## **2. Cultivo de células germinales primordiales (PGCs) y células germinales embrionarias (EGCs) de ratón:**

### **2.1. Aislamiento y cultivo PGCs:**

#### 2.1.1. Tampones y soluciones:

- PBS: Tampón fosfato salino, sin  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{Mg}^{+2}$ , pH 7.0 (Gibco/Invitrogen).
- Tripsina/EDTA: 0.05% tripsina y 0.53 mM EDTA en HBSS (Sigma).
- Solución *Fast Red/Naftol fosfato* (solución para tinción de fosfatasa alcalina): 1 mg/ml de solución de Fast red TR salt (Sigma) en  $\text{H}_2\text{O}$ . Al cual se añadieron 40  $\mu\text{l/ml}$  de la solución Naphtol AS-MX fosfato (Sigma).

#### 2.1.2. Medios de cultivo:

- Medio de cultivo básico de PGCs: DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) con 4,5 g/L de glucosa (Gibco/Invitrogen), suplementado con 15% Suero bovino fetal (Gibco/Invitrogen), glutamina a 2 mM (Gibco/Invitrogen), penicilina–estreptomicina al 1% (Invitrogen) y piruvato sódico a 1 mM (Sigma). Al medio de cultivo básico de PGCs se añadieron los siguientes factores de crecimiento: ligando de Kit ó Stem cell factor, rmSCF (R&D Systems) a 10 ng/ml, Factor Inhibidor de Leucemia, mLIF (Millipore) a 1000 U/ml, y Forskolina (Sigma) a 100 $\mu\text{M}$ . Estas condiciones de cultivo se denominaron control. Cuando se adicionó el Factor de crecimiento básico de fibroblastos, hbFGF (ORF Genetics) a 1 ng/ml a las anteriores condiciones de cultivo, llamamos a esta nueva condición, control positivo.
- Medio de cultivo básico de EGCs: DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) con 4,5 g/L de glucosa (Gibco/Invitrogen), suplementado con 15% Suero bovino fetal (Gibco/Invitrogen), glutamina a 2 mM (Gibco/Invitrogen), penicilina–estreptomicina al 1% (Invitrogen), piruvato sódico a 1 mM (Sigma) y  $\beta$ -mercaptoetanol a 0,1 mM (Sigma). Al medio de cultivo básico se añadió el factor de crecimiento mLIF (Millipore) a 1000 U/ml.
- Medios de cultivo de EpiSC: Medio EpiSC1 (Guo et al., 2009): Activin A (20ng/ml; R&D Systems) y bFGF (12 ng/ml; R&D Systems) en medio N2B27

(Guo et al., 2009); Medio EpiSC2 (Tesar et al., 2007): DMEM-F12 (Invitrogen) suplementado con 20% knockout serum replacement (KSR; Invitrogen), bFGF 5ng/ml, 0,1 mM 2-mercaptoethanol, 2mM L-glutamina (Sigma), y 0,1mM de Aminoácidos no esenciales (Gibco/Invitrogen).

- Medio de cultivo básico para línea celular STO: DMEM con 4,5 g/L de glucosa (Gibco/Invitrogen), suplementado con 10% Suero bovino fetal (Gibco/Invitrogen), glutamina a 2 mM (Gibco/Invitrogen), penicilina-estreptomicina al 1% (Invitrogen) y piruvato sódico a 1 mM (Sigma).
- Medio de cultivo básico para células PMEFs CF1: DMEM con 4,5 g/L de glucosa (Gibco/Invitrogen), suplementado con 10% Suero bovino fetal (Gibco/Invitrogen), glutamina a 2 mM (Gibco/Invitrogen), penicilina-estreptomicina al 1% (Invitrogen), piruvato sódico a 1 mM (Sigma) y 0,1 mM de Aminoácidos no esenciales (Gibco/Invitrogen).

#### 2.1.3. Fijador:

Paraformaldehído (PFA) al 4%: se disolvieron 4g PFA (Panreac) en 100 ml de PBS, se calentó la disolución hasta 60°C y se añadió una solución de NaOH4N gota a gota hasta que la solución de paraformaldehído se volvió transparente. Finalmente se ajustó el pH de la solución hasta 7,4.

#### 2.1.4. Disección de embriones de 8,5 *d.p.c.* y cultivo de PGCs:

Para el aislamiento de las PGCs se utilizaron embriones de ratón de 8,5 *d.p.c.* (*days post coitum*) debido a la facilidad de disección y al mayor rendimiento obtenido en el crecimiento de las PGCs en cultivo con respecto a embriones en estados de desarrollo posteriores (De Felici, 2000). Dicho aislamiento se llevó a cabo según el protocolo descrito por De Miguel y Donovan en el año 2000. La edad de los embriones se calculó mediante la observación del tapón vaginal en las hembras, designado como 0,5 *d.p.c.*, asumiéndose que el coito tiene lugar a media noche. Las ratonas preñadas se diseccionaron en un ambiente lo mas estéril posible con materiales de disección estériles. En primer lugar, se diseccionó el abdomen con ayuda de unas tijeras cortando la piel y el peritoneo para dejar al descubierto las dos ramas del útero. Usando unos fórceps, se separó cada sitio de implantación cortando el útero entre ellos, muy cerca de cada embrión permitiendo que la decidua sobresaliera. Las placentas diseccionadas se colocaron en una placa petri con PBS frío. Bajo un microscopio estereoscópico (Lan Optics) y con ayuda de luz fría (Edmund Optics) se extrajeron los embriones atravesando la decidua con un par de fórceps finos (Dumont #55) y se aplicó presión con los fórceps en la base de la decidua para permitir que el embrión saliera a través de la hendidura. Las membranas extraembrionarias se diseccionaron y eliminaron y se aisló el tercio posterior de cada embrión, que

incluye el extremo caudal de la línea primitiva y el alantoides (Figura 5). En este momento del desarrollo embrionario, de 50-100 PGCs se localizan en el cruce de la línea primitiva y la base del alantoides. Los fragmentos de embrión se recogieron en un tubo cónico con PBS frío se guardaron en hielo hasta el siguiente paso de tripsinización.

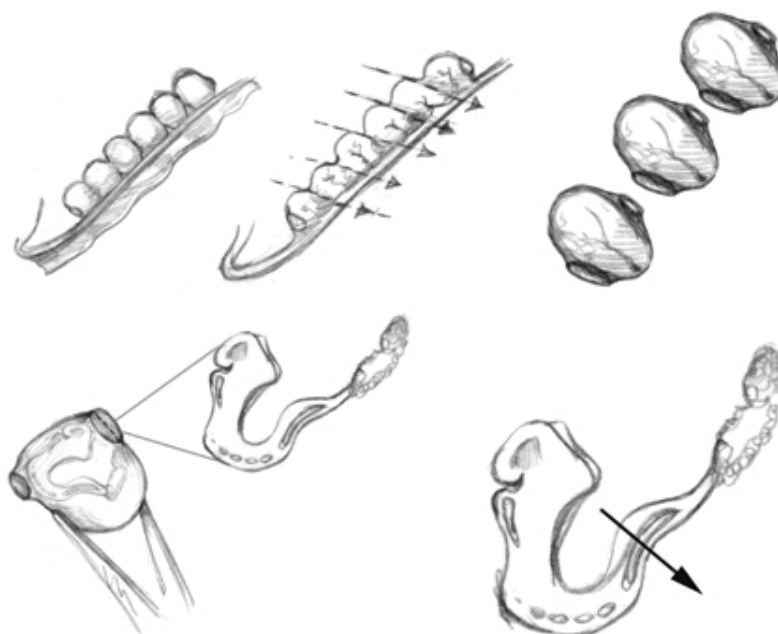


Figura 5: Esquema de disección de un embrión de 8,5 d.p.c de ratón  
(Esquema extraído de De Miguel & Donovan, 2003).

A continuación se llevó a cabo el paso de digestión y homogenización de los fragmentos embrionarios aislados. Para ello se eliminó el PBS del tubo y se añadió 1 ml de la solución de tripsina/EDTA, incubándose durante 8 minutos a 37°C. A continuación se eliminó dicha solución cuidadosamente y se añadió el volumen apropiado de medio de cultivo básico de PGCs para inhibir la acción de la tripsina. Para homogeneizar los fragmentos de tejido embrionario se pipeteó lentamente con una micropipeta hasta que se consiguió una solución de células individuales. Las células se diluyeron en medio básico de cultivo de PGCs suplementado con los factores de crecimiento. El volumen final de dilución se calculó en función del número estimado de PGCs aisladas y se sembraron posteriormente en placas de cultivo en las que se había sembrado previamente una monocapa de células nutricias STO. Las PGCs se cultivan de forma rutinaria sobre una monocapa confluyente de células nutricias mitóticamente inactivadas, las STO. Dichas células son una línea de fibroblastos embrionarios transformados de ratón (STO, Sandoz Thioguanine- and Ouabain-resistant cell line, disponibles en American Type Culture Collection # CRL-1503™). Estas células producen tanto la forma soluble como la transmembrana del factor de crecimiento SCF, el cual es requerido para la y

supervivencia y proliferación de las PGCs en cultivo (Resnick et al., 1992). Las células STO se mantuvieron en cultivo en medio básico de la línea celular STO y se realizaron los pases necesarios para mantenerlas en un estado de subconfluencia. Para preparar la monocapa de células nutricias STO sobre las que se sembraron las PGCs, el día previo a la disección se recubrieron pocillos de una placa de cultivo con gelatina porcina al 0,1% w/v (Sigma) durante una hora. A continuación se aspiró la gelatina y se lavaron los pocillos con PBS. Las células tripsinizadas STO se sembraron en placas de cultivo a una densidad de  $\sim 15 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> y se dejaron toda la noche en un incubador para permitir adherirse a la placa de cultivo. El mismo día del aislamiento de PGCs, la monocapa de las células STO fue previamente  $\gamma$ -irradiada con una dosis de 50Gy (5000 rads) para inducir parada en el ciclo celular. Se utilizaron 3 irradiadores diferentes: Tubo de rayos X Smart 200E con caja protectora Kraut Kramer Foster y unidad de control SmartS83; acelerador ELEKTA Sli y acelerador ELEKTA Precise (Elekta). Después de la irradiación se eliminó el medio de cultivo inmediatamente y se añadió nuevo medio de cultivo básico de STO. El número de PGCs sembradas sobre la monocapa de células STO irradiadas dependió del tipo de placa de cultivo sobre el cual se sembraron dichas PGCs. En placas de cultivo de 96 pocillos (Corning) se sembró una proporción de 1 embrión por pocillo, es decir, un número estimado de 50-100 PGCs por pocillo, en placas de cultivo de 24 pocillos (Corning) se sembraron 6 embriones por pocillo (300-600 PGCs/pocillo) y en placas de cultivo de 6 pocillos (Corning) se sembraron unos 15 embriones/pocillo (750-1500 PGCs/pocillo). Para los experimentos de eficiencia de reprogramación se utilizaron placas de cultivo Terasaki de 384 pocillos (BD Falcon) y se sembró un número estimado de 1 PGC por pocillo. Las PGCs cultivadas se colocaron bien en un incubador (Hera Cell 150, Heraeus) a 37°C que mantuvo una atmósfera de 95% de aire y un 5% de CO<sub>2</sub> (condiciones de Normoxia) o en un incubador CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub> (MCO-18M; Sanyo) a 37°C que mantuvo una concentración de O<sub>2</sub> del 3% y un 5% de CO<sub>2</sub> (condiciones de Hipoxia). La duración de los cultivos en estas condiciones fue variable dependiendo de cada tipo de experimento. También se indujo hipoxia de forma química, añadiendo al medio de cultivo el agente mimético de hipoxia, Cl<sub>2</sub>Co (Merck) a una concentración 150  $\mu$ M y en los a los tiempos indicados en los resultados. El Cl<sub>2</sub>Co induce hipoxia de manera artificial en los cultivos a través del bloqueo de la degradación de HIF's, el principal grupo de factores de transcripción que media la respuesta primaria transcripcional inducida por la hipoxia en las células.

El medio de cultivo de las PGCs fue cambiado diariamente, aspirando un ½ del volumen final y añadiendo medio nuevo con factores de crecimiento.

## **2.2. Identificación de PGCs y EGCs**

### **2.2.1. Tinción de fosfatasa alcalina**

Las PGCs y las colonias de EGCs pueden distinguirse de las células somáticas acompañantes y la monocapa de células nutricias porque son positivas para la enzima fosfatasa alcalina (Ginsburg et al., 1990) la cual constituye además un marcador de células pluripotentes.

Para llevar a cabo la tinción de fosfatasa alcalina, la cual tiñe a las células positivas de un rojo intenso, se lavaron los cultivos de PGCs 3 veces con PBS sin  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{Mg}^{+2}$  y se fijaron con PFA (Panreac) al 4% a pH 7,4 durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente los cultivos se lavaron una vez con  $\text{H}_2\text{O}$  y se incubaron en oscuridad con la solución de tinción de fosfatasa alcalina, *Fast Red/Naftol fosfato* durante al menos 45 minutos a temperatura ambiente. Después de la tinción los cultivos de PGCs se lavaron una vez con  $\text{H}_2\text{O}$  y se almacenaron a 4°C hasta su posterior observación y análisis. Las fotografías se realizaron en un microscopio óptico invertido (Axiovert 200, Zeiss) conectado a una cámara fotográfica Nikon DS-U2 y el software NIS-Elements F22 (Nikon).

### **2.2.2. Recuento celular**

Mediante un microscopio óptico invertido (Axiovert 200, Zeiss) se procedió a contar el número total de células teñidas y de colonias por pocillo. Se consideró colonia toda agrupación compacta de 8 o más células teñidas, considerando que estas células habían sufrido reprogramación, ya que las PGC crecen de forma aislada, mientras que las EGC lo hacen en forma agrupada en colonias (Donovan et al., 1986).

### **2.2.3. Estudio Estadístico**

En experimentos de recuento celular el estudio estadístico se realizó mediante la t de Student, con un nivel de significación del 0'05 utilizando el programa Sigma Plot Scientific Graphing System 4.10 (Systal Software). Para la representación gráfica de las medias y desviaciones estándar del número de PGC, EGCs y colonias de cada una de las diferentes condiciones de cada experimento, realizadas por triplicado, se utilizó el programa Microsoft Excel 2002 para Windows.

## **2.3. Derivación de EGCs**

Para la obtención de líneas de células EGCs a largo plazo, se cultivaron células PGCs como se ha indicado anteriormente, sobre una monocapa de células STO previamente irradiadas. Se utilizaron placas de 6 pocillos y se mantuvieron en cultivo durante 7-9 días en medio básico de cultivo de PGCs, al cual se añadieron factores de crecimiento dependiendo de las condiciones de cultivo. Al cabo de 7-9 días se seleccionaron colonias de células EGCs Oct4-GFP positivas de este cultivo primario, que morfológicamente recordaban a colonias de las células madre embrionarias de ratón, mESC, para ser subcultivadas en una nueva placa de cultivo para su posterior expansión. Las colonias de células EGCs

se picaron manualmente una a una con una pipeta de vidrio y se transfirieron a una nueva placa de cultivo en la que se había sembrado previamente una monocapa confluyente de fibroblastos embrionarios de ratón (PMEFs CF-1, Millipore) mitóticamente inactivados. La monocapa de células PMEF-CF1 se sembró el día anterior a la selección y pase de colonias de EGCs, a una densidad de  $20 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> y se  $\gamma$ -irradiaron (60 Gy) la mañana de su uso. Una vez transferidas, las colonias de células EGCs se mantuvieron en cultivo a 37°C en condiciones de hipoxia o normoxia con medio básico de PGCs suplementado con el factor de crecimiento LIF. Los siguientes subcultivos se realizaron cada 5-6 días.

### 3. Líneas celulares

Las líneas celulares usadas en este estudio así como sus características se detallan en la siguiente tabla (**Tabla 1**):

Línea Celular	Especie	Origen	Medio de Cultivo
EGC TGC10	<i>Mus musculus</i> , ratón	Células germinales embrionarias derivadas de células germinales primordiales	DMEM-GlutaMax <sup>TM</sup> 10% FBS 0,1% $\beta$ -mercaptoetanol 1% P/S LIF (1000 U/ml)
E14T	<i>Mus musculus</i> , ratón	Células madre embrionarias derivadas de blastocisto	GMEM 10% FBS- ES qualified 2 mM L-Glutamina 0,1 mM MEM 0,1 mM $\beta$ -mercaptoetanol 1 mM PyrNa <sup>+</sup> LIF (1000U/ml)
COS-7	<i>Cercopithecus aethiops</i> , mono	Fibroblastos de riñón transformados con el antígeno T del virus SV40	DMEM-GlutaMax <sup>TM</sup> 1 mM PyrNa <sup>+</sup> 10% FBS 1% P/S
STO	<i>Mus musculus</i> , ratón	Fibroblastos embrionarios	DMEM-GlutaMax <sup>TM</sup> 1 mM PyrNa <sup>+</sup> 10% FBS 1% P/S



#### 4. Inmunofluorescencia

Las células pueden caracterizarse mediante el análisis de la expresión de sus proteínas y marcadores de membrana, para ello se utilizó la técnica de inmunofluorescencia (IF) que permite el análisis de dichas proteínas y marcadores a través de la tinción específica con anticuerpos.

##### 4.1. Anticuerpos primarios (Tabla 2):

Anticuerpo	Origen	Dilución	Referencia
SSEA1	Ratón. Monoclonal	1:200	R&D Systems
Oct-3/4	Conejo. Policlonal	1:200	Santa Cruz Biotechnology
c-Myc	Conejo. Policlonal	1:25	Santa Cruz Biotechnology
Klf-4	Cabra. Monoclonal	1:100	R&D Systems
HIF-1 $\alpha$	Conejo. Policlonal	1:1500	Desarrollado por la Dra. Berra (CIC bioGUNE, Derio, España)

##### 4.2. Anticuerpos secundarios (Tabla 3):

Anticuerpo	Origen	Dilución	Fluorocromo/molécula conjugada	Referencia
IgM anti-ratón	Cabra	1:200	FitC	Sigma
IgM anti-ratón	Cabra	1:350	Texas Red	Vector Labs
IgG anti-conejo	Cabra	1:100	biotina	Vector Labs
IgG anti-conejo	Burro	1:200	Alexa Fluor 568	Invitrogen
IgG anti-conejo	Burro	1:500	biotina	Jackson Laboratory

### 4.3. Doble IF indirecta frente a marcadores pluripotentes en PGCs/EGCs

Previamente a la IF, se colocaron en placas de cultivo de 24 pocillos cristales de tipo *chamber-slides* (Fisher) estériles y se recubrieron con gelatina porcina al 0,1% (w/v) (Sigma) durante 1 hora, tras lo cual se lavaron con PBS. Sobre estos se sembró la monocapa de células STO. Al día siguiente se  $\gamma$ -irradió la monocapa confluyente de STO y se sembraron sobre ésta las PGCs, las cuales se mantuvieron en cultivo como se ha indicado anteriormente. Como controles positivos se utilizaron las líneas celulares pluripotentes, EGC-TGC10 y E14T, las cuales se sembraron de igual manera con las excepciones de que las EGC-TGC10 se sembraron sobre una monocapa de MEF tratados con mitomicina C (inactivados mitóticamente) (Millipore) y las E14T se sembraron directamente sobre los cristales estériles recubiertos con gelatina porcina al 0,1% (w/v), al no necesitar monocapa de células nutricias para sobrevivir.

Posteriormente, se realizó la doble inmunofluorescencia con uno de los anticuerpos primarios marcadores de pluripotencia (Oct3/4, c-Myc o Klf-4) y por otro lado con el anticuerpo primario frente a SSEA1 (R&D Systems), molécula de adhesión con un importante papel en los procesos de compactación y migración de las PGC (Fenderson et al., 1987) y que, como ya hemos visto, es expresada tanto en células madre pluripotentes como en PGCs, por lo que sirvió para localizar tanto las PGCs como las EGCs. Con el fin de asegurar la observación de las proteínas buscadas, se amplificó la señal mediante el uso de anticuerpos secundarios biotinilados. En el caso del marcaje por SSEA1 y c-Myc no hizo falta al ser la señal suficientemente intensa sin amplificación (Fenderson et al., 2006). La técnica de IF se llevó a cabo siguiendo el siguiente protocolo:

1. Fijación: PFA (Panreac) al 4% , 10' a temperatura ambiente (RT).
2. Lavados con PBS: 3 x 5', cada uno.
3. Permeabilización: Tritón x-100 (Sigma) 0.2 % (w/v), 10' a RT.
4. Lavados con PBS: 3 x 5', cada uno, a RT.
5. Bloqueo: 10% suero en PBS + 1% (w/v) Albúmina Sérica Bovina (BSA, Sigma) 1h RT. Se utilizaron suero de caballo (Sigma) o cabra (Sigma) en función del anticuerpo secundario utilizado.
6. Anticuerpos primarios: se diluyeron en PBS con 1% (w/v) BSA y se incubaron con los cultivos durante toda la noche a 4°C en una cámara húmeda.
7. Lavados con PBS: 3 x 5', cada uno, a RT.
8. Anticuerpos secundarios se diluyeron en PBS con 1 (w/v) BSA y se incubaron en oscuridad 30' a RT.

9. Lavados con PBS: 3 x 5', cada uno, a RT y en oscuridad.
10. En el caso de anticuerpos secundarios biotinilados, Avidin Fluorescein (Vector) 1:500 en PBS, 10' a RT y en oscuridad.
11. Lavados con PBS: 3 x 5', cada uno, a RT y en oscuridad.
12. Contratación de los núcleos con DAPI (4',6-Diamidino-2-fenilindol diclorhidrato, Sigma), colorante fluorescente que tiñe el DNA, 0,5 µg/ml en PBS 5' en oscuridad.
13. Montaje en portaobjetos de los cristales con las células en medio de montaje para fluorescencia Vectashield (Vector) 1:10 en PBS.
14. Observación de las muestras con microscopio de fluorescencia (Axiovert 200, Zeiss). Las fotografías se tomaron con la cámara fotográfica Nikon DS-U2 conectada a dicho microscopio y el software NIS-Elements F22 (Nikon).

#### **4.4. Doble IF indirecta frente a HIF-1 $\alpha$ en PGCs**

Para observar la expresión de HIF-1 $\alpha$  en los cultivos de PGCs, se realizó una IF siguiendo un protocolo similar al ya descrito con algunas leves diferencias:

- Se utilizaron células COS-7 en hipoxia e hipoxia química (CoCl<sub>2</sub>) como control positivo, sembradas directamente sobre cristales estériles recubiertos con gelatina porcina al 0,1% (w/v).
- El bloqueo consistió en 0,2% gelatina en PBS + 1% BSA, 30' a RT.
- El anticuerpo primario anti-HIF1 $\alpha$  se diluyó en la solución de bloqueo (1:500).
- El anticuerpo secundario utilizado fue anti-conejo biotinilado (Jackson Laboratory) (1:500).
- En lugar de Avidin-Fluorescein se utilizó Streptavidin-Cy3 (Jackson Laboratory) 1:5000 en PBS, 20' a RT y en oscuridad.

#### **5. Citometría de Flujo**

La Citometría de Flujo es una técnica en la cual células en suspensión (previamente marcadas con fluorocromos) pasan a través de un flujo laminar sobre un punto láser. Como consecuencia del impacto, se produce una dispersión de luz policromática generada por los diferentes fluorocromos, que permiten obtener diversas mediciones relacionadas con las propiedades físicas y químicas de cada célula.

En este estudio se llevaron a cabo dos tipos de citometría de flujo: una citometría de flujo analítica y una separación celular por citometría de flujo o “Cell Sorting”. En este último tipo, se lleva a cabo la separación física de células en suspensión marcadas con fluorocromos en base a la expresión diferencial de uno o varios parámetros analizables por la citometría de flujo analítica.

### **5.1. Citometría de flujo analítica en PGCs**

La expresión de Oct4 en PGC se cuantificó por citometría de flujo analítica. Para ello en primer lugar se llevó a cabo una inmunofluorescencia en la que se usó el anticuerpo anti SSEA-1 (R&D Systems) para marcar las PGC tras el cultivo de PGC en condiciones de normoxia e hipoxia a diferentes días. Dado que nuestras células proceden de ratones transgénicos que expresan GFP bajo el promotor de Oct4, se pudo cuantificar la expresión de Oct4 sin necesidad de marcaje por anticuerpos.

#### **5.1.1. IF anti-SSEA1**

- a. Se preincubaron los anticuerpos primario y secundario Anti-SSEA1 1:200 + anti-ratón APC (eBioscience) 1:200 durante 30' a 37°C en el diluyente PBS+ 10% FBS.
  - i. Como control negativo se utilizó Isotipo IgM hecho en ratón (Sigma) + anti-ratón APC.
- b. Se levantaron los cultivos celulares con tripsina como se describió para el pase de las EGCs.
- c. Se centrifugaron las suspensiones celulares para eliminar la tripsina a 400 g durante 5' a 4°C.
- d. Se resuspendieron las células con la mezcla de anticuerpos preincubados y se incubaron a 37°, 30' en oscuridad.
- e. Se lavaron 2 veces durante 5' con la solución de lavado (igual que el diluyente de anticuerpos) y se centrifugaron a 400 g.
- f. Se resuspendieron en el diluyente final, PBS + 2% FBS y 5 mM EDTA (Sigma).

#### **5.1.2. Adquisición celular por Citometría de Flujo**

Las poblaciones celulares se adquirieron en el citómetro de flujo fluorescente (FACS Calibur; Becton Dickinson) equipado con un laser de 405nm, 488nm y 633nm y para el análisis se utilizó el programa Cell Quest Pro (Becton Dickinson).

### 5.1.3. Análisis estadístico

El análisis de los datos obtenidos a partir de las gráficas de contorno con transformada logarítmica se realizaron mediante el test estadístico F-Snedecor con la participación del Servicio de Bioestadística del Hospital Universitario La Paz.

## 5.2. Aislamiento de PGCs por Cell Sorting

El aislamiento de las células derivadas del cultivo de PGCs en hipoxia durante 6 días se llevó a cabo mediante citometría de flujo de tipo “Cell Sorting”. Al igual que en el caso anterior, las PGCs se marcaron con el anticuerpo anti SSEA-1 (R&D Systems) por IF. Como control negativo se utilizaron células STO  $\gamma$ -irradiadas negativas para dicho marcador. Posteriormente se separó la población de interés en un citómetro de tipo separador o “Cell Sorter”.

### 5.2.1. IF anti-SSEA1

El protocolo llevado a cabo fue muy similar al descrito en el apartado anterior con las siguientes diferencias:

- Como anticuerpo secundario se utilizó anti-ratón IgM-Texas Red (Vector) 1:200.
- Se sustituyó el PBS por DMEM (Gibco, Invitrogen) en la solución de lavado y diluyente final.
- Como último paso se añadió a la suspensión celular el fluorescente DAPI (Sigma) (0,5  $\mu$ g/ml).

### 5.2.2. Adquisición y aislamiento celular por Cell Sorting

Las distintas poblaciones celulares se adquirieron en el citómetro FACS ARIA IIu (Becton Dickinson) equipado con un láser de 407nm, 488nm y 633nm. Como software de adquisición se usó el programa FACS Diva v6. Una vez aisladas las poblaciones SSEA1+ de las células PGCs se centrifugaron en una microcentrífuga (Eppendorf) a 1500 rpm durante 5 minutos y se resuspendieron en buffer de lisis RLT (Qiagen) y se guardaron a -80°C hasta su posterior utilización en el paso de aislamiento de RNA.

## 6. Análisis del perfil transcripcional global de PGCs por *Microarrays*

Para analizar la expresión diferencial de genes en las células PGCs cultivadas en hipoxia se utilizó la técnica de *Microarrays*. Un *Microarray* consiste en series ordenadas de puntos microscópicos en los cuales hay depositados oligonucleótidos de DNA de hebra sencilla de una secuencia específica. Estas sondas se unen a una superficie sólida o se inmovilizan a “microbeds” en un “chip”, en el cual la posición exacta de cada tipo de sonda está definida. Las muestras con cantidades desconocidas de especies de ácidos nucleicos (dianas) pueden hibridarse en el chip en condiciones de alta astringencia. A continuación la hibridación sonda-diana es detectada y cuantificada basándose en un marcado previo de las secuencias diana con un fluoróforo, determinándose así la abundancia relativa de distintas secuencias de ácidos nucleicos de la muestra.

Una aplicación común de la tecnología de microarrays es el perfil transcripcional global: se miden simultáneamente los niveles de expresión de miles de genes, o en otras palabras, a través de esta tecnología puede analizarse la composición de todo el transcriptoma de un tipo celular.

Los chips de microarrays utilizados para esta Tesis (Illumina MouseRef-8 v2.0 BeadChip Expresión) contienen más de 25.000 sondas que cubren la mayor parte del transcriptoma conocido de ratón. Además, cada tipo de sonda se representa en aproximadamente 30 puntos diferentes sobre la superficie del chip, por lo que cada especie de RNAm diana puede medirse varias veces, eliminándose así variaciones inespecíficas.

### 6.1. Preparación de las muestras

Antes de la hibridación de las muestras a analizar en el chip de Microarrays el RNA total debe ser amplificado y marcado. En nuestro estudio además, se llevó a cabo un paso previo de pre-amplificación debido a la pequeña cantidad de RNA total obtenido de las PGCs tras su aislamiento por citometría de flujo de tipo *Cell Sorting*.

#### 6.1.1. Extracción de RNA de las PGCs

Con el fin de extraer el RNA de la población SSEA1+ de PGCs cultivadas en hipoxia y aisladas posteriormente por *Cell Sorting*, se utilizó el kit RNeasy mini Kit (Qiagen). Se recolectaron un total de ~6.800 PGCs (formadas por la mezcla de las poblaciones SSEA1+/GFP+ y SSEA1+/GFP-) y se dividieron en dos muestras independientes (PGC1 y PGC2). Las células se diluyeron en el buffer de lisis RLT del kit y luego se procedió a la extracción siguiendo las indicaciones descritas por el fabricante empleando cromatografía en microcolumnas. Mediante espectrofotometría se llevó a cabo la cuantificación del RNA (midiendo la Absorbancia a 260 nm) y se estimó la pureza del mismo a través del ratio de Absorbancia 260/280 nm. De la muestra PGC1 se obtuvo 1 ng de RNA y de PGC2 5 ng de RNA de alta calidad.

### 6.1.2. Aislamiento y pre-amplificación del cDNA de las células PGCs.

Para la obtención del cDNA y su pre-amplificación se utilizó el kit TargetAmp 2-Round Biotin-aRNA Amplification Kit (TebuBio). Este kit emplea el procedimiento “Eberwine” mejorado (Van Gelder et al., 1990) en el que se puede llevar a cabo la amplificación de cantidades muy pequeñas de RNA (desde 10 pg). La estrategia se basa en la unión del RNA total con oligonucleótidos sintéticos que contienen la secuencia promotora de la RNA polimerasa T7 unida en el extremo 5' a una región poly-T (T7-Oligo-(dt)). Después de la síntesis del cDNA a partir de la muestra del RNA total, se lleva a cabo una reacción de transcripción en la que se usa la RNA polimerasa T7 para la amplificación del RNA antisentido (aRNA) generado.

El procedimiento consistió en añadir a la muestra de RNA total los oligos T7-Oligo (dt) e incubar la mezcla en el termociclador 5 minutos a 65°C y 30 minutos a 50°C para su unión específica. Después se llevó a cabo una primera ronda de síntesis de las dos hebras de DNAc usando una DNA polimerasa proporcionada por el kit. Para la reacción de síntesis se incubó la mezcla en el termociclador a 65°C 10 minutos, 3 minutos a 80°C y se dejó enfriar en hielo. Para terminar la reacción se incubó a 37°C 10 minutos en el termociclador y finalmente 3 minutos a 80°C. A continuación se realizó el proceso de transcripción *in vitro* con la RNA polimerasa T7 para la obtención del RNA antisentido (aRNA) a partir de DNAc sintetizado. Para ello la reacción se incubó en el termociclador con los programas: 42°C, 4 horas y 37°C, 15 minutos. Posteriormente se realizó una segunda ronda de síntesis de las dos hebras de DNAc usando la transcriptasa inversa SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen) y una mezcla de random primers (cebadores cortos, la mayoría hexámeros, sintetizados al azar en cuanto a su composición). Los programas del termociclador usados para la síntesis de la primera hebra del cDNA fueron los siguientes: 5 minutos a 65°C; 1 hora a 37°C; 20 minutos a 37°C y 2 minutos a 95°C. Los programas del termociclador para la síntesis de la segunda hebra del cDNA fueron los siguientes: 70°C, 5 minutos; 42°C, 10 minutos; y 37°C, 10 minutos/80°C, 3 minutos. El último paso consistió en una reacción de transcripción *in vitro* en la que se incorporaron nucleótidos UTP marcados con biotina a los transcritos de RNA obtenidos y para la que se usó la RNA polimerasa T7. Los programas usados en el termociclador para este paso fueron los siguientes: 42°C, 9 horas a 4°C, 37°C y 15 minutos a 4°C. Este último paso representa simultáneamente una amplificación (múltiples copias de cRNA son transcritas a partir de cada molécula de cDNA de doble cadena) y el marcado de las moléculas de cRNA obtenidas. Finalmente se llevó a cabo un paso adicional de purificación para medir el rendimiento del proceso (por espectrometría) así como la integridad de las moléculas de cRNA (por electroforesis en un Bioanalizador).

Las muestras de RNA de las poblaciones EG, ESCm, ESCf, EpiE3, EpiT9, GC10++, GC10+-, GC12++y GC12+- se prepararon como se ha descrito previamente para las muestras PGC1 y PGC2, usando columnas RNeasy (Qiagen) con digestión del DNA “on-column”. Sin embargo al obtener una gran cantidad de RNA de dichas muestras, se usó un kit diferente (Ambion) para la amplificación

lineal y la síntesis de de cDNA de doble hebra ligado a T7, en el cual se omitió el paso previo de pre-amplificación. Se usaron 300 ng de RNA total por muestra como entrada para dicho protocolo, y finalmente la purificación de las moléculas cRNA se realizó de igual manera que para las muestras PGC1 y PGC2.

## **6.2. Hibridación de las muestras en el chip de *Microarrays***

Las muestras de RNA a analizar por *microarrays* de las poblaciones PGC1, PGC2 y EG se prepararon como se ha indicado en los apartados anteriores, obteniendo finalmente el cRNA marcado y purificado. El cRNA marcado de las muestras PGC1, PGC2 y EG fue desnaturalizado e hibridado al chip durante toda la noche a 58°C en un buffer especial. Cada chip Illumina contiene varios *arrays* independientes, así que las dos muestras pudieron ser hibridadas en la misma superficie del chip. La muestra líquida del chip se eliminó tras varios lavados, dejando solo las moléculas diana que se habían adherido fuertemente a las sondas por un apareamiento astringente de las pares de bases. A continuación, los chips se incubaron con el fluoróforo Cy-3 conjugado con estreptavidina (GE Healthcare), el cual se une de forma específica a los residuos de biotina incorporados a las moléculas cRNA. De esta modo, las posiciones en el chip con la mayor cantidad de cRNA unido se cuantifican como la mayor concentración local del marcador fluorescente. Finalmente, el chip se secó mediante centrifugación.

## **6.3. Procesamiento y análisis estadístico de datos del *Microarrays***

El chip fue escaneado, y la intensidad de fluorescencia de las microesferas en cada punto del chip (correspondiente a las distintas sondas con secuencia conocida) se escanearon usando el lector iScan (Illumina) y su software acompañante (Bead Studio 3.2, Illumina). El conjunto de datos “en crudo” obtenidos fueron procesados siguiendo varios pasos:

- La corrección de fondo (comparación de la señal de la sonda a la señal de los puntos de control negativo o espacio entre puntos) se llevó a cabo siguiendo el modelo de análisis Robust Multi-array Affymetrix (RMA) publicado por Irizarry et al., 2003.
- La normalización de la expresión génica (división por la intensidad de los genes “housekeeping” (beta-actina y GAPDH) o la intensidad media de todas las sondas) se calculó con el método aplicado en el pack Lumi del R-Bioconductor y la estabilización de la varianza se llevó a cabo usando una escala logarítmica de log2.
- Finalmente se obtuvo el promedio de los replicados y el cálculo de la relación de expresión entre la muestra y el control biológico. El procesamiento de datos y gráficas se llevó a cabo con la herramienta



de software matemático Matlab. El cluster jerarquizado de los genes y las muestras se desarrollaron con una correlación métrica y la distancia promedio no ponderada (UPGMA) se llevó a cabo por el método de vinculación.

Posteriormente, junto con los datos obtenidos de los *Microarrays* de las muestras PGC1, PGC2 y EG se llevó a cabo la comparación y agrupación *in silico* de los datos de *Microarrays* obtenidos de otras poblaciones celulares analizadas en el laboratorio del Dr. Hans R. Schöler del Instituto Max Plank de Medicina Molecular. Las poblaciones celulares utilizadas en los *Microarrays* fueron las siguientes: varias líneas celulares de EGCs de ratón (designadas en el análisis de datos de microarrays como GC12++, GC12+-, GC10++, GC10+-), dos líneas celulares de ESC de ratón (designadas en el análisis de datos de microarrays como ESCm y ESCf), dos líneas celulares de EpiSCs de ratón (designadas en el análisis de datos de microarrays EpiT9 y EpiE3) y por últimos una población de PGCs de 11,5 *d.p.c* (designadas en el análisis de datos de microarrays como PGC11.5).

## **7. Análisis por PCR a tiempo real o cuantitativa (RT-qPCR)**

Con el fin de comparar la expresión génica de un grupo de genes de interés en PGCs cultivadas durante 48 horas en normoxia e hipoxia, se llevó a cabo el análisis de éstos mediante la técnica de RT-qPCR. Para ello se elaboraron los siguientes pasos:

### **7.1. Extracción de RNA**

Para extraer el RNA de la población SSEA1 + aisladas por citometría de flujo de células PGCs cultivadas en normoxia e hipoxia se utilizó el kit RNeasy mini Kit (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se recolectaron un total de 4133 PGCs en la condición de normoxia y 5091 en hipoxia. Las células se diluyeron en el buffer de lisis RLT del kit y luego se procedió a la extracción siguiendo las indicaciones descritas por el fabricante empleando cromatografía en microcolumnas.

### **7.2. Reacción de transcripción reversa**

Una vez aislado el RNA se procedió a obtener el DNA copia (cDNA), para ello se llevó a cabo la reacción de retro-transcripción usando el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems). Este kit usa un conjunto de primers o cebadores aleatorios para la iniciación de la síntesis del cDNA. Estos primers aseguran que la síntesis de la primera hebra de cDNA ocurre de forma eficiente en todas las moléculas de RNA mensajeros (RNAm) presentes.

### **7.3. Pre-amplificación del cDNA**

Una vez obtenido el cDNA y antes de cuantificar la expresión génica, se llevó a cabo un paso previo de pre-amplificación del cDNA usando el kit TaqMan® PreAmp Master Mix Kit

(AppliedBiosystems) para incrementar la cantidad de cDNA específico para el posterior análisis de la expresión génica por PCR.

#### 7.4. Reacción o amplificación de cDNA mediante RT-pPCR

La reacción de amplificación del cDNA en tiempo real se llevó a cabo usando el kit Quantimix Easy kit (Biotools) y fluoróforos intercalantes. A la mezcla de reacción Qantimix Easy Master Mix PCR Master Mix se añadió SYBR-GREEN (Invitrogen) 1000X en DMSO y los cebadores o primers en un volumen final de 20 µl y se siguieron las instrucciones del fabricante. Los fragmentos de DNA utilizados como primers se diseñaron considerando la amplificación en el limite del exón, de forma que una posible contaminación por DNA genómico no influiría en los resultados y podría ser detectada por las curvas de Melting en experimentos de PCRq. Los amplicones seleccionados tuvieron una longitud que varió entre 60 y las 150 pares de bases. Además todos los primers confirmaron tener temperaturas de anillamiento de aproximadamente 60°C usando el software Primer3 WWW Primer Tool desarrollado por WhiteheadInstituteforBiomedicalResearch (Cambridge) y disponible en la pagina web [http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3\\_w.w.w.cgi](http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_w.w.w.cgi). Todos los primers confirmaron su unión específica con el gen de interés correspondiente usando Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) disponible en la pagina web <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>. La lista de los primers diseñados se enviaron a la casa comercial Bonsai para su síntesis, la cual aseguró la especificidad y calidad de los mismos (**Tabla 4**):

Especificidad	Secuencia [sentido (F) /antisentido (R)]
Dppa3 (Stella)	F: 5'tgttcggattgagcagaga3' R: 5'ggcagaaagtcagagacatc3'
Blimp1	F: 5'gtctgtgccaagacgttcg 3' R: 5'gaaaggccgttctccactg 3'
Bnip3	F: aaacagcactctgtctgagga3' R: gcttcgggtgttataaaagga3'
PPAR $\gamma$	F: 5'tgggatgtctcacaatgc3' R: 5'tgggttcagctggtcgata 3'

El programa para la reacción de amplificación del cDNA en tiempo real incluyó un primer paso de desnaturalización de 5 minutos a 95°C y posteriormente un conjunto de 40 ciclos de 10 segundos a 95°C, 10 segundos a 58°C para el anillamiento de los primers, 30 segundos a 72°C para la síntesis de cDNA y 5 segundos a diferente temperatura dependiendo del producto de fusión para la medida de

producto. Finalmente se llevó a cabo un programa para elaborar la curva de Melting, que iba desde los 75°C a los 95°C con un incremento de la tasa de temperatura de 0.1°C/segundo para la detectar la pérdida de fluorescencia y por tanto detectar los productos finales contenidos en las muestras. En este kit la señal fluorescente es generada por el intercalado inespecífico de las moléculas de fluoróforo en los productos de DNA de doble hebra. En la fase exponencial de la amplificación existe una correlación entre la cantidad de producto amplificado y la masa de DNA molde, y el nivel de fluorescencia generado es proporcional al producto amplificado en cada ciclo. Cada muestra fue analizada por duplicado y la media del duplicado fue utilizada para calcular el nivel de expresión del mRNA de interés. Para cada gen se incluyó una muestra control negativo que contenía el mix de la reacción y los primers pero no cDNA. La cantidad de mRNA del gen de interés fue normalizada respecto a la cantidad de  $\beta$ -actina (utilizando el método de comparación de  $2^{-\Delta CT}$  de acuerdo a las indicaciones del fabricante), que fue considerado como el control positivo endógeno.

## **8. Agregación de células PGCs/EGCs a mórulas de 8 células para la generación de quimeras**

### **8.1. Aislamiento de células PGCs/EGCs por “cell picking” manual**

El cultivo de PGCs en condiciones de hipoxia se llevó a cabo como se ha descrito anteriormente, sembrando las células sobre una monocapa de STO  $\gamma$ -irradiadas en placas de cultivo de 6 pocillos (Corning). Las células se mantuvieron en cultivo durante 6 días, tras lo cual se picaron pequeñas agrupaciones de EGCs Oct4-GFP positivas con la ayuda de un capilar de vidrio bajo el microscopio de fluorescencia (Zeiss) y se mantuvieron en medio de cultivo básico de EGCs al que se añadió el tampón HEPES (20 mM, Invitrogen) para mantener el pH, hasta el siguiente paso de transferencia de embriones.

### **8.2. Protocolo de agregación**

El siguiente protocolo de agregación se llevó a cabo en la Unidad de Transgénicos del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO, Madrid).

#### **8.2.1. Materiales:**

- Aceite mineral (Sigma)
- Aguja punta roma para pocitos (DN-09, BLS Ltd.)
- Aguja para lavado de oviductos (# 30 G, con punta redondeada)
- Capilares de vidrio de borosilicato (Harvard Apparatus LTD)

- Cápsulas de cultivo 35mm, 60 mm y 100 mm
- Filtros 0.20µm (Sartorius)
- Hormonas: PMSG (Gonadotropina sérica de yegua gestante; Sigma) y hCG (Gonadotropina coriónica humana; Sigma)
- Medios de cultivo: M2 (Sigma) y KSOM (Specialty Media)
- Solución Tyrode'sac. (Sigma, # T-1788)
- Anestesia: Avertina

#### 8.2.2. Protocolo de hormonación para superovulación de hembras donantes

Se consideró un ciclo de luz de 6h-20h (punto medio del período de oscuridad alrededor de las 24h) y se tomó como día 0 el día de la agregación. Según esto el esquema seguido fue el siguiente:

A día -5: se realizó una inyección intraperitoneal de PMSG (5U/hembra), de 13-14 h.

A día -3: se realizó una inyección intraperitoneal de hCG (5U/hembra), de 12-13 h y se pusieron los cruces con los machos fértiles (una hembra hormonada por cada macho).

A día -2: se seleccionaron las hembras fecundadas por la presencia de tapón vaginal (día 0,5 *d.p.c.*).

El día 0 (agregación): se obtuvieron los embriones en estadio de mórula (8 células) considerado el estadio ideal para la agregación de las hembras con tapón positivo a día E2.5.

#### 8.2.3. Protocolo de obtención y lavado de embriones de las hembras donantes

En primer lugar se sacrificaron las hembras donantes por dislocación cervical. A través de una incisión transversal en el abdomen y de un corte en el peritoneo se accedió al aparato reproductor. Con la ayuda de una pinza fina se sujetó el cuerno uterino y con unas tijeras se separó el mesometrio. A continuación se hizo un primer corte entre el oviducto y el ovario y un segundo corte entre el oviducto y el útero. Los oviductos se transfirieron a una placa de 35 mm con medio M2 (suplementado con antibióticos) a temperatura ambiente. Los embriones entre estadios de desarrollo comprendidos entre una célula y mórula temprana se obtuvieron perfundiendo el oviducto con una pequeña cantidad de medio M2, utilizando una jeringa con 1 ml de medio y una aguja de 30 G con punta roma bajo el microscopio estereoscópico. Finalmente se seleccionaron los embriones de acuerdo a su morfología y se transfirieron a varias gotas de medio M2 para su lavado.

#### 8.2.4. Agregación

Una vez obtenidos los embriones se les extrajo la zona pelúcida exponiéndolos brevemente a una solución de Tyrode's. A continuación se lavaron al menos 4 veces en medio M2 para eliminar bien los restos de la solución de Tyrode's y se colocó cada embrión en un pocito preparado en una cápsula de cultivo en gotas de KSOM cubiertas con aceite mineral. Para la transferencia de los embriones se usó una pipeta de transferencia y se colocó un grupito (5-15 células) de células EGCs Oct4-GFP positivas sobre cada embrión, incubándose a 37° C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% aire, toda la noche. A las 24 y 48 horas se observó mediante microscopía confocal la incorporación de las células PGCs/EGCs Oct4-GFP a las células del embrión (agregados) que se había desarrollado al estadio posterior de blastocisto. Las imágenes obtenidas fueron adquiridas con el microscopio confocal Leica TCS-SP5, con un objetivo de inmersión en glicerol de 63x (HCX PL APO 1.30 N.A). El software utilizado para para la captura fue LAS AF v2.1.

## *Resultados*

---



## 1. Efecto de la hipoxia en el crecimiento y la reprogramación de PGCs

Para determinar el efecto de la hipoxia en el crecimiento y la reprogramación de PGCs a EGCs se llevaron a cabo varios experimentos. En un primer diseño experimental se estudió la dinámica en el crecimiento de las PGC y la formación de colonias EGC, para ello se sembraron PGCs en condiciones de normoxia e hipoxia y se fijaron los cultivos en los días 1, 3 y 7. El resultado reveló una mejora significativa en la proliferación de PGCs y la generación de EGCs en hipoxia con respecto a normoxia, la condición control, al cabo de 7 días (Figura 6).

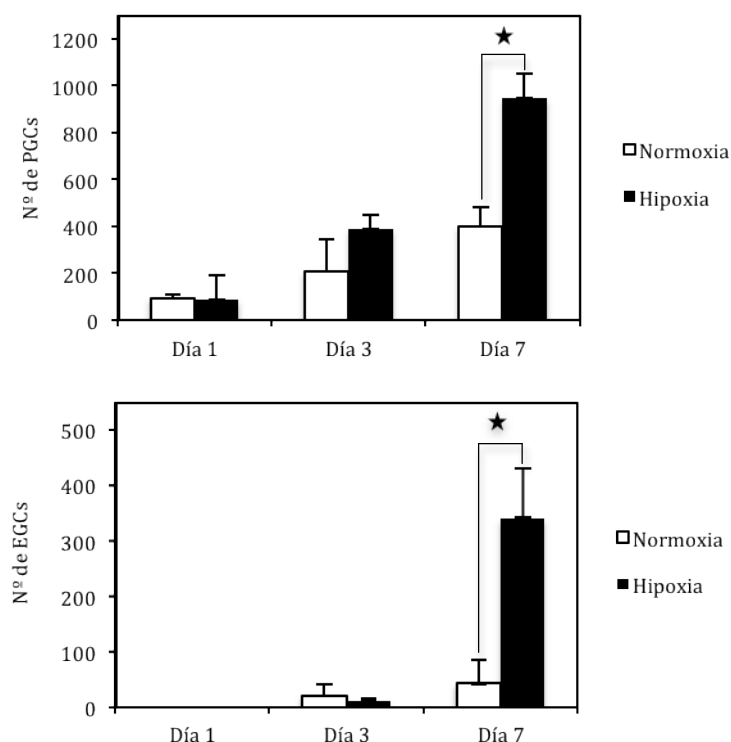


Figura 6 : Número de PGCs y EGCs en normoxia e hipoxia a día 1, 3 y 7 del cultivo. El número de PGCs y EGCs aumenta significativamente en hipoxia con respecto a normoxia a día 7. Los datos corresponden a un experimento representativo con muestras por triplicado. La estrella designa una diferencia significativa según el test estadístico *t*-Student, con un valor de  $p \leq 0,05$ ).

En un segundo diseño experimental, este aumento en el número de PGCs reprogramadas a EGCs se observó también con respecto a las colonias obtenidas en presencia del factor bFGF y de 2i+LIF, ambos clásicos tratamientos utilizados para la reprogramación de las PGCs (Figura 7). Por otro lado, la combinación de hipoxia y de 2i+LIF no contribuyó a aumentar significativamente el número de células EGCs. Estos resultados demuestran que la hipoxia es capaz de reprogramar PGC a EGCs de forma similar a como lo hacen bFGF y 2i+LIF.



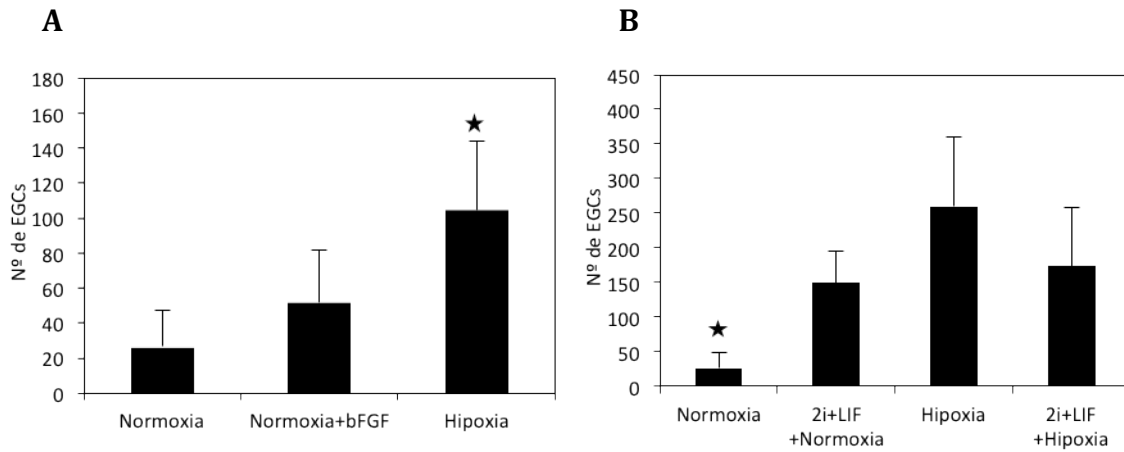


Figura 7: Cultivo de PGCs reprogramadas a EGCs durante 7 días. El número de EGCs en hipoxia aumenta con respecto a normoxia, incluso en presencia de bFGF (**A**) o de 2i+LIF (**B**). Los datos corresponden a un experimento representativo con muestras por triplicado. La estrella designa una diferencia significativa según el test estadístico *t*-Student, con un valor de  $p \leq 0,05$ .

## 2. Caracterización de las hiEGL

### 2.1. Caracterización fenotípica de EGCs obtenidas bajo condiciones de hipoxia

Habiendo observado efectos positivos en la reprogramación celular de las PGCs a EGCs en hipoxia, se comprobó que las colonias de EGCs obtenidas bajo estas condiciones poseían las mismas características, tales como la morfología, la expresión de fosfatasa alcalina (TNAP) y la expresión de Oct4-GFP, que colonias de EGCs obtenidas en normoxia y en presencia del factor de crecimiento bFGF (Figura 8).

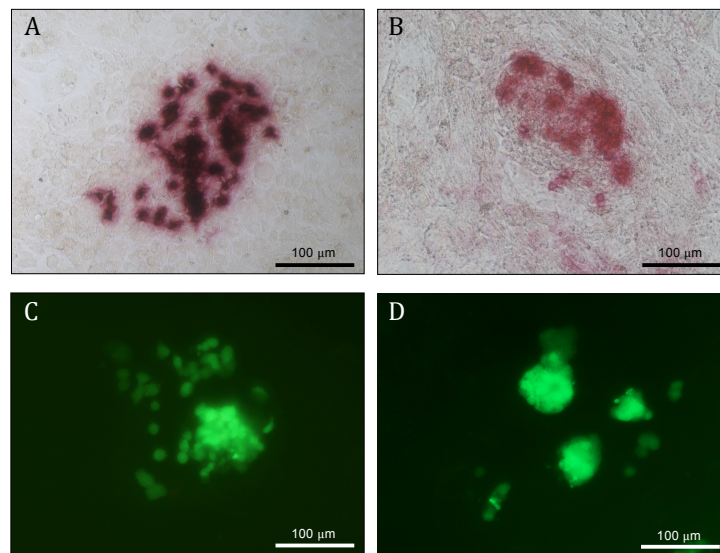


Figura 8: Fotografías representativas de células EGCs en cultivo. **A**: Fotografía de contraste de fase de colonias de EGCs TNAP positivas (en rojo) obtenidas bajo condiciones de hipoxia. **B**: Fotografía de contraste de fase de colonias de EGCs TNAP positivas obtenidas bajo condiciones de normoxia + bFGF. **C**: Fotografía de fluorescencia de colonias de EGCs Oct4-GFP positivas obtenidas bajo condiciones de hipoxia. **D**: Fotografía de fluorescencia de colonias de EGCs Oct4-GFP positivas obtenidas bajo condiciones de normoxia + bFGF.

A continuación se procedió a aumentar el tiempo de cultivo de las células con el fin de obtener una línea celular de EGCs. De esta manera se comprueba que las colonias obtenidas constituyen verdaderas EGCs, ya que las PGCs no sobreviven más de una semana en cultivo y las EGCs pueden mantenerse indefinidamente *in vitro*. Los cultivos se mantuvieron durante varias semanas, realizando subcultivo semanal. Aunque se pudieron realizar los pases adecuadamente, no llegamos a observar la presencia de colonias positivas para Oct4-GFP y TNAP más allá de la tercera semana (pase 2).

La incapacidad de estas células para sobrevivir a largo plazo en cultivo nos llevó a pensar en una posible identidad diferente de célula madre pluripotente a la de EGC. Para profundizar más en ello, se analizaron los niveles de expresión de dos marcadores de células del linaje germinal, *Blimp1* y *Stella*, mediante RT-qPCR en PGCs en hipoxia y normoxia, observándose una clara disminución en condiciones hipóxicas (Figura 9).

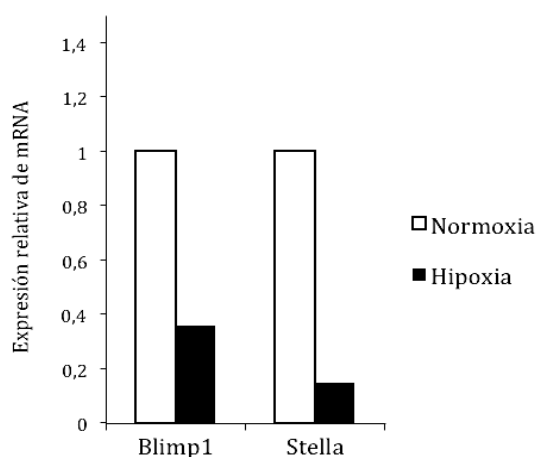


Figura 9 : Niveles de expresión relativos de los marcadores germinales *Blimp1* y *Stella* en PGCs tras 48 horas en cultivo en condiciones de normoxia e hipoxia.

La disminución temprana de la expresión de ambos marcadores en PGCs en hipoxia constituyó un indicativo de que la reprogramación estaba teniendo lugar y nos condujo a pensar en una posible inducción de EpiSC a partir de PGCs, las cuales no requieren la expresión de *Blimp1* para su generación (Bao et al., 2012), expresan Oct4, Nanog y Sox2 (al igual que PGCs y EGCs) y mantienen la expresión de *Stella* a muy bajos niveles, a diferencia de las células germinales y de las mESC (Brons et al., 2007). Para ello se procedió a cultivar estas células en diferentes medios específicos para EpiSC (denominados Medios EpiSC1 y EpiSC2) bajo condiciones de hipoxia, considerando que su cultivo en condiciones no adecuadas podría ser el motivo de su no supervivencia a largo plazo. Al cultivar las PGC en hipoxia con estos medios se redujo drásticamente el número de colonias en cultivo derivadas de éstas, en relación con el medio utilizado habitualmente (Medio Control) (Figura 10). Habiendo observado el efecto perjudicial de estos medios sobre las PGC se procedió a utilizarlos únicamente tras el primer pase, después de haber obtenido colonias en medio PGC en hipoxia. Las pocas colonias que se mantuvieron en cultivo con estos medios no sobrevivieron más tiempo que con

el medio propio de EGC, descartando así una posible inducción de EpiSC a partir de las PGCs en hipoxia.

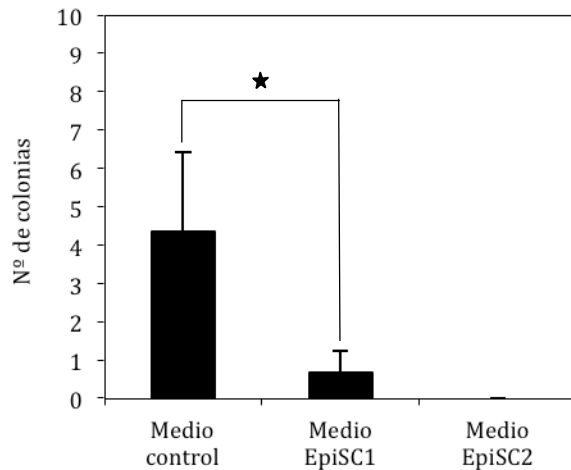


Figura 10: Número de colonias EGC obtenidas tras 7 días en cultivo bajo condiciones de hipoxia y en diferentes medios de cultivo: Medio control (medio PGCs) y Medios específicos para el cultivo de células EpiSCs (Medios EpiSC1 y EpiSC2). La estrella designa una diferencia significativa según el test estadístico *t*-Student, con un valor de  $p \leq 0,05$ .

El hecho de que la hipoxia favoreciera adquisición de pluripotencialidad de PGCs a través de la generación de colonias de EGCs pero posteriormente no contribuyera al mantenimiento de la autorrenovación de éstas *in vitro*, nos llevó a plantearnos una caracterización tanto transcriptómica como funcional de estas células, las cuales denominamos **hiEGL** (del inglés, *hypoxia-induced EG-like*).

## 2.2. Caracterización funcional de las hiEGLs *in vivo*

La pluripotencia inducida por hipoxia en las PGCs se caracterizó funcionalmente a través de la diferenciación *in vivo* de las hiEGL mediante la agregación a mórulas y la integración de las mismas en blastocistos. Para ello se cruzaron ratones Oct4-GFP con ratones Katushka, generándose ratones dobles transgénicos, en los cuales las células de todos los tejidos mostraron fluorescencia en rojo, al expresar la proteína Katushka y las células que expresaban el factor de transcripción Oct4 mostraron fluorescencia GFP en verde. Las células hiEGL mostraron por tanto fluorescencia en rojo y en verde, y tras ser cultivadas 6 días en hipoxia fueron aisladas y agregadas a mórulas hospedadoras provenientes de ratones C57BL6 no transgénicos. Tras 24 horas en cultivo se vió que dichas células se habían agregado a las mórulas y en algunos casos, tras 48 horas, se habían integrado en la ICM y en el trofoblasto de blastocistos, mostrando la expresión de Oct4-GFP y de la proteína Katushka (Figura 11 y Figura 12).

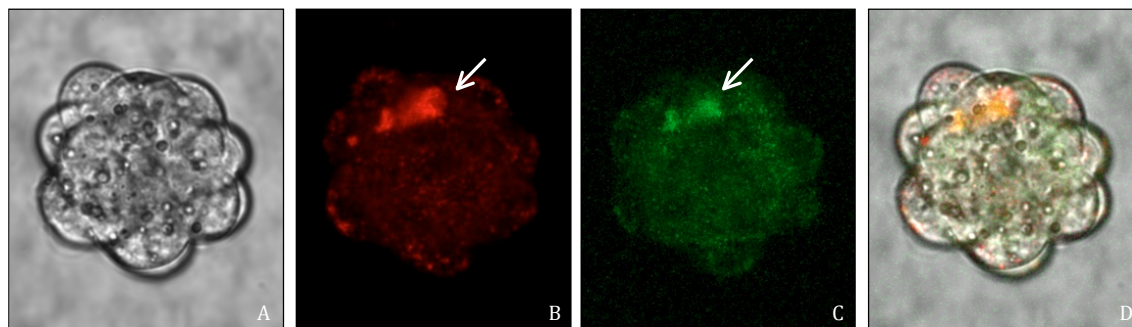


Figura 11: Imágenes representativas de la agregación de células hiEGL Oct4-GFP/Katushka a una mórula C57BL6 hospedadora. **A:** Imagen de contraste de fase de la mórula C57BL6. **B:** Imagen de fluorescencia que muestra las células hiEGL expresando la proteína Katushka (indicadas por la flecha). **C:** Imagen de fluorescencia que muestra las células hiEGL expresando la proteína Oct4-GFP (indicadas por la flecha). **D:** Imagen resultado de la superposición de A, B y C.

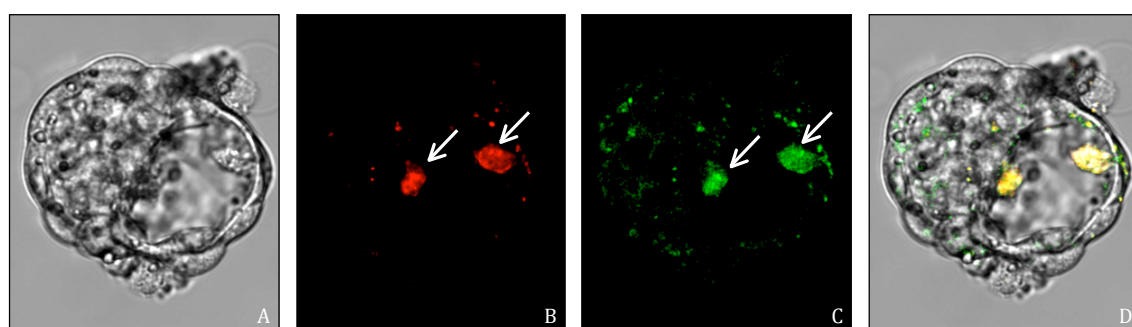


Figura 12: Imágenes representativas de la integración tanto en la ICM como en trofoblasto de células hiEGL Oct4-GFP/Katushka en blastocisto C57BL6 hospedador. **A:** Imagen de contraste de fase del blastocisto C57BL6. **B:** Imagen de fluorescencia que muestra las células hiEGL expresando la proteína Katushka (indicadas por las flechas). **C:** Imagen de fluorescencia que muestra las células hiEGL expresando la proteína Oct4-GFP (indicadas por las flechas). **D:** Imagen resultado de la superposición de A, B y C.

## 2.3. Caracterización de la expresión génica diferencial de las células hiEGL mediante *microarrays* de DNA

### 2.3.1. Aislamiento de hiEGL mediante *Cell Sorting*

Para llevar a cabo el análisis de la expresión diferencial de las hiEGL mediante *microarrays*, en primer lugar se llevó a cabo el aislamiento de dichas células, las cuales se cultivaron en hipoxia durante 6 días. El aislamiento se realizó mediante la técnica de citometría de flujo de tipo *Cell Sorting*, utilizándose los marcadores Oct4-GFP y SSEA1. Como control negativo se utilizó la monocapa de células nutricias STO, negativas para ambos marcadores. Se recogieron tanto las poblaciones de hiEGL SSEA1+/GFP+ como SSEA1+/GFP-. El aislamiento de ambas poblaciones se realizó en varias tandas debido al escaso número de células obtenidas en cada uno de los experimentos realizados (Figura 13).

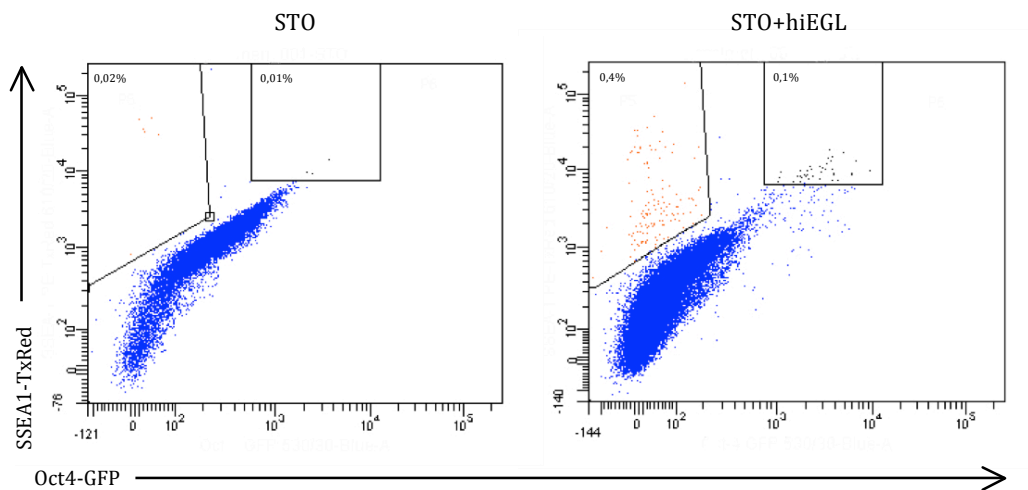


Figura 13: Representaciones gráficas de tipo “dot plot” obtenidas por citometría de flujo que muestran la expresión de GFP y SSEA1 de las poblaciones analizadas. En la gráfica de la izquierda se observa la ausencia de ambos marcadores en la población STO (control negativo). La gráfica de la derecha muestra las poblaciones de hiEGLs SSEA1+/GFP- (0,4% =1000 células) y SSEA1+/GFP+ (0,1% =150 células).

### 2.3.2. Análisis de la expresión génica diferencial de hiEGL por *Microarrays*

La caracterización génica de las células inducidas por hipoxia, hiEGL, se llevó a cabo mediante el uso de chips de DNA o *microarrays*. Mediante esta técnica se ha llevado a cabo la comparación del perfil de expresión génica de células hiEGL con células madre pluripotentes ESC, EGC, EpiSC, GSC y como control, células unipotentes PGCs de 11,5 dpc. Se han identificado genes en las PGCs que modifican su expresión tras su cultivo en hipoxia así como diferencias génicas con respecto a las otras poblaciones analizadas. En total se han llevado a cabo 18 *arrays* diferentes correspondientes a 12 poblaciones celulares diferentes. La lista de las muestras de las distintas poblaciones utilizadas se detalla a continuación:

1. **EG**: corresponde a una línea de células EGC sometidas a hipoxia química ( $\text{CoCl}_2$ ) durante 4 horas.
2. **PGC1 y PGC2**: corresponden a muestras por duplicado obtenidas del total de células PGCs (8,5 dpc) de ratón cultivadas durante 6 días en hipoxia 3%  $\text{O}_2$  y aisladas en nuestro laboratorio (denominadas posteriormente como hypoxia- induced EG-like; **hiEGL**).
3. **ESCm y ESCf**: corresponden a dos líneas celulares pluripotentes ESC de ratón.
4. **EpiT9 y EpiE3**: corresponden a dos líneas celulares pluripotentes EpiSC de ratón.
5. **PGC11.5**: células PGCs (11,5 dpc) de ratón.
6. **GC12++**, **GC12+-**, **GC10++**, **GC10+-**: corresponden a 4 líneas celulares pluripotentes de EGCs de ratón.

Como se indica anteriormente las muestras EG y PGC1 y PGC2 fueron cultivadas en condiciones hipóxicas, el resto de las poblaciones celulares utilizadas se cultivaron bajo condiciones de normoxia.

En primer lugar se llevó a cabo el Análisis de Componentes Principales (*PCA*, *Principal Component Analysis*) a partir de los datos obtenidos de los *microarrays*. Este análisis implica una técnica en estadística descriptiva, en la cual tratamos de reducir la dimensionalidad del problema para extraer conclusiones sobre el comportamiento de los genes en nuestros experimentos. El *PCA* es un procedimiento matemático que transforma un número de (posibles) variables correlacionadas en un número (más pequeño) de variables no correlacionadas llamadas componentes principales. El primer componente principal representa toda variabilidad en los datos como sea posible, y cada uno de los componentes posteriores representa toda la variabilidad restante posible.

En nuestro caso, los tres primeros componentes principales explican el 73% de la variabilidad de la expresión génica. El primer componente principal (PC1) captura el 48% de la variabilidad de la expresión génica, el segundo componente principal (PC2) captura el 18% de la variabilidad y el tercer componente principal (PC3) captura el 7,3% de la variabilidad.

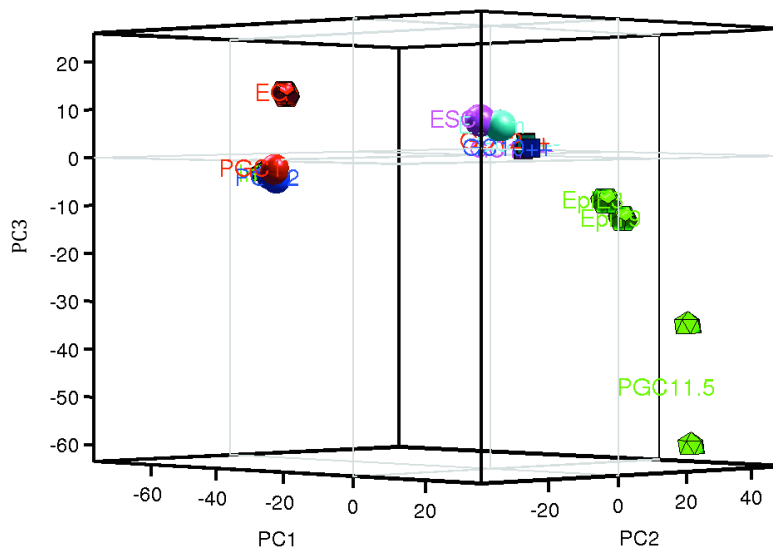


Figura 14: Representación gráfica del Análisis de Componentes principales (PCA) en 3D de los datos obtenidos de los *microarrays*. Los símbolos utilizados son los siguientes: La población de EG está representada por un dodecaedro rojo, la población PGC1 está representada por una esfera roja, la población PGC2 está representada por una esfera azul, la población ESCm está representada por una esfera de color cian, la población ESCf está representada por una esfera magenta, las poblaciones EpiT9 y EpiT3 están representada por dodecaedros verdes, la población PGC11,5 está representada por un icosaedro verde, la población GC12++ está representada por un cubo rojo, la población GC12+- está representada por un cubo magenta, la población GC10++ está representada por un cubo azul y finalmente la población GC10+- está representada por un cubo cian.

El primer componente principal separa las muestras EG, PGC1, PGC2 (coordenadas negativas) de las muestras ESCm, ESCf, EpiT9, EpiT3, PGC11,5, GC12++, GC12+-, GC10++, GC10+-

(coordenadas positivas). El segundo componente principal separa las muestras EG, ESCm, ESCf, GC12++, GC12+-, GC10++, GC10+- (coordenadas negativas) de las muestras PGC1, PGC2, EpiT9, EpiE3, PGC11.5, (coordenadas positivas). Según reveló este análisis, las células inducidas por hipoxia hiEGL (PGC1 y PGC2) demostraron agruparse con las células EG (ambas en rojo), ya que las distancias entre las células hiEGL y las EGC fueron más pequeñas que las distancias entre hiEGL y el resto de las poblaciones celulares analizadas (en azules y verdes) (Figura14).

En segundo lugar, para analizar la influencia de la hipoxia en la variación del transcriptoma de las hiEGL se llevó a cabo un análisis de los genes diferencialmente expresados en las distintas poblaciones celulares. Los *perfiles de expresión* obtenidos de las distintas poblaciones analizadas se representan a continuación mediante gráficos de dispersión por parejas (*Pairwise scatter plot*) y mapas de color (*Heat maps*).

El *Pairwise scatter plot* es un tipo de representación gráfica la cual constituye un diagrama de dispersión que muestra la correlación de los niveles de expresión entre dos muestras. Las muestras utilizadas para realizar este análisis fueron: EG, hiEGL, ESCm, EpiE3 y PGC11.5. Cada punto en el gráfico representa el nivel de expresión génica de un transcrito en dos muestras. La proyección horizontal corresponde al nivel de expresión en la primera muestra y la proyección vertical se corresponde con el nivel de expresión en la segunda muestra. Cuanto más similares sean dos muestras (dos poblaciones celulares), más puntos se agruparán cerca de la diagonal en la gráfica de dispersión. Utilizando un incremento de 2 en una escala logarítmica log2, se puede calcular el porcentaje de genes expresados de forma similar (*Per-Similar*) o diferencial (*Per-different*) entre las dos poblaciones analizadas, así como el coeficiente de correlación de Fisher (R). Los porcentajes se calculan con respecto al número total de transcritos (25697) en el *microarrays*. En las siguientes figuras (Figuras 15, 16, 17 y 18) y la tabla 5, se muestran los resultados obtenidos de este análisis entre las poblaciones estudiadas, destacando la posición de los “genes Yamanaka”.

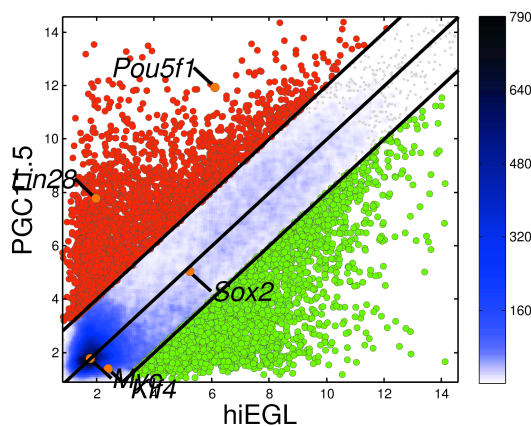


Figura 15: *Scatter plot* en el que se compara la expresión génica global entre las poblaciones hiEGL y PGC11.5.

El análisis *Pairwise scatter plot* entre la población hiEGL y la población control PGC11,5 reveló un valor de *Per-similar* del 76,2 % y de *Per-different* del 23,8 %.



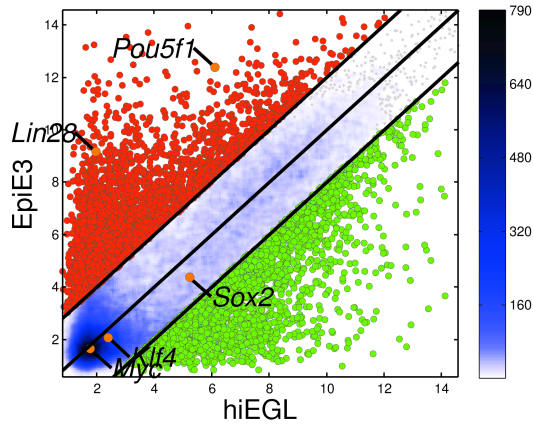


Figura 16: Scatter plot en el que se compara la expresión génica global entre las poblaciones *hiEGL* y *EpiE3*.

El análisis *Pairwise scatter plot* entre la población *hiEGL* y la población de células pluripotentes *EpiE3* reveló un valor de *Per-similar* del 77,3 % y de *Per-different* del 22,7 %.

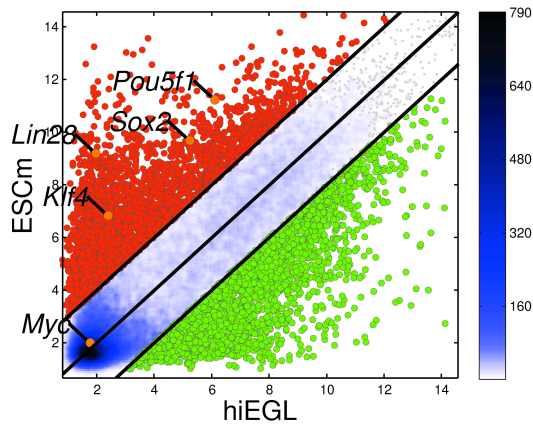


Figura 17: Scatter plot en el que se compara la expresión génica global entre las poblaciones *hiEGL* y *ESCm*.

El análisis *Pairwise scatter plot* entre la población *hiEGL* y la población de células pluripotentes *ESCm* reveló un valor de *Per-similar* del 75,8 % y de *Per-different* del 24,2 %.

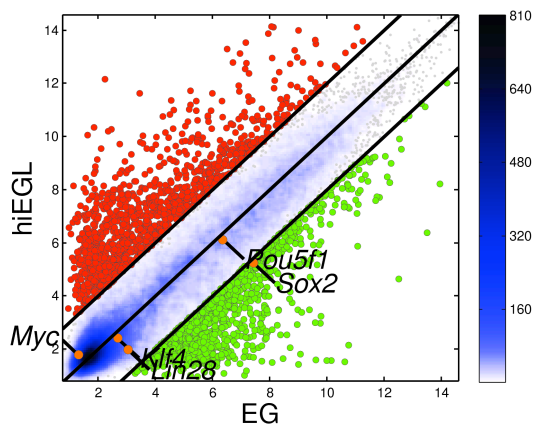


Figura 18: Scatter plot en el que se compara la expresión génica global entre las poblaciones *hiEGL* y *EG*.

El análisis *Pairwise scatter plot* entre la población *hiEGL* y la población de células pluripotentes *EG* reveló un valor de *Per-similar* del 91,6,8 % y de *Per-different* del 8,41 %.



	hiEGL	EG	ESCM	EpiE3	PGC11,5
hiEGL	1	0,911	0,767	0,772	0,746

**Tabla 5:** Tabla que muestra los coeficientes de correlación de Fisher (R) entre las poblaciones analizadas.

El conjunto de datos obtenidos por el análisis *Pairwise scatter plot* mostró que el porcentaje de genes diferencialmente expresados entre la población hiEGLs y las poblaciones PGCs 11,5 d.p.c, EpiE3 y ESCm cultivadas en normoxia eran muy similares (~20%). Sin embargo este porcentaje disminuyó considerablemente entre las hiEGL y la población de células pluripotentes EG cultivadas en hipoxia (~8%). En las gráficas puede observarse también como se han destacado los genes de pluripotencia usados clásicamente en la generación de células iPSC (Lin28, c-Myc, Klf4, Sox2 y Pou5f1 o Oct4). Los resultados revelaron que estos genes se encuentran más diferencialmente expresados entre las poblaciones hiEGL y ESCm (Figura17) y más similarmente expresados entre hiEGL y la población EG (Figura18) al encontrarse más cerca de la diagonal en la representación grafica. Además puede apreciarse en la tabla que muestra los coeficientes de correlación de Fisher (R), como este valor que mide la correlación lineal entre dos muestras ( $R \leq 1$ ) es mayor entre las poblaciones hiEGL y EG y menor entre hiEGL y la población control de células unipotentes PGC11,5. (Tabla 5).

Otra forma de representar los perfiles de expresión de las distintas poblaciones analizadas por los *microarrays* es a través de algoritmos clasificatorios, llamados comúnmente “mapas de color” (*Heat maps*). La siguiente figura muestra el *Heat map* obtenido (Figura 19), el cual se llevó a cabo utilizando las sondas cuyo rango o variación entre todas las muestras fue de al menos 7.

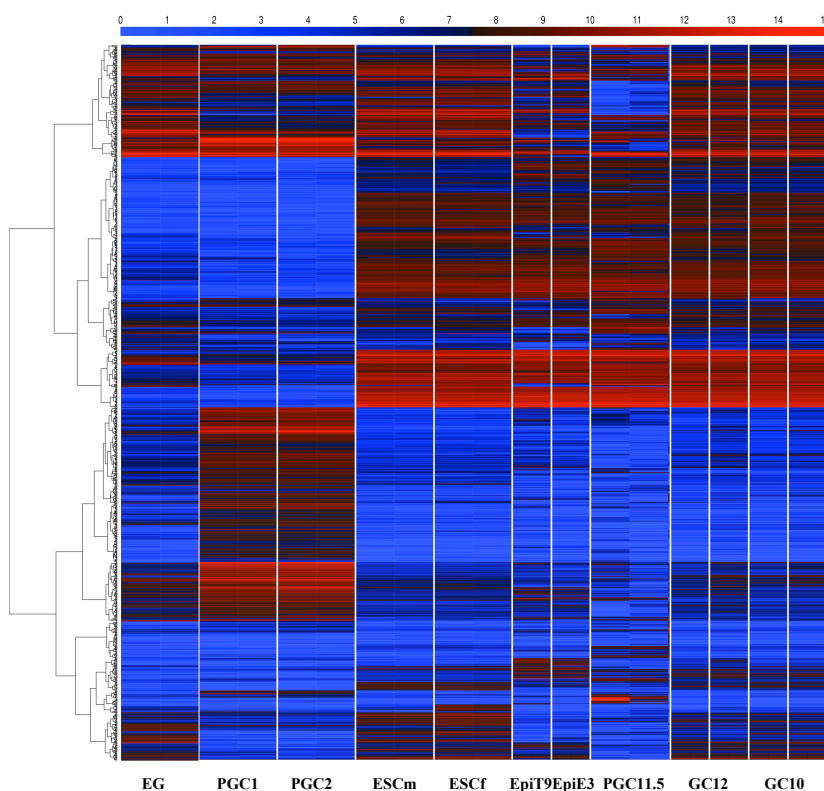


Figura 19: *Análisis de la expresión génica diferencial de las poblaciones celulares analizadas representado por un Heat map. En la representación, la barra de color en la parte superior codifica la expresión génica en una escala log2 y el código de color indica que cuanto mayor sea la expresión génica más rojo es el color.*

En la representación puede observarse como las diferentes muestras pertenecientes a un mismo tipo celular poseen patrones de expresión génica muy similares, como ocurre entre ESCm y ESCf, EpiT9 y EpiE3 y entre las líneas de células EGCs (GC12++, GC12+-, GC10++ y GC10+-). De igual forma la población hiEGL, formada por los duplicados PGC1 y PGC2, no muestran variabilidad entre ellos. De forma general puede observarse como las poblaciones de células pluripotentes (ESCm, ESCf, EpiE3, EpiT9 y GC's) y la población de células PGC11,5, todas ellas cultivadas en normoxia, poseen un patrón génico muy parecido entre ellas y que difiere sustancialmente de la población de células pluripotentes EG y de las poblaciones PGC1 y 2, las cuales han sido cultivadas en hipoxia.

Con el fin de profundizar más en el estudio de genes diferencialmente expresados en las hiEGL que pudieran estar implicados en la adquisición de pluripotencialidad y la represión de su capacidad de autorrenovación, se elaboraron varias tablas (Tablas 6, 7, 8 y 9) a partir de los datos numéricos obtenidos del *Heat map*. En las tablas se desglosan genes diferencialmente expresados en las distintas poblaciones celulares, pertenecientes a vías de señalización molecular relacionadas con procesos de pluripotencia y diferenciación celular, metabolismo y remodelación de la cromatina..

En una primera aproximación al análisis de la expresión génica diferencial de las hiEGL con respecto al resto de poblaciones celulares analizadas, se decidió estudiar el nivel de expresión de los genes implicados en la inducción de las células pluripotentes iPSC (Tabla 6).

<b>Inducción de iPSC</b>	<b>EG hipox</b>		<b>PGC 1</b>		<b>PGC 2</b>		<b>ESCm</b>		<b>ESCf</b>		<b>Epi T9</b>	<b>Epi E3</b>	<b>PGC 11,5</b>		<b>EG 12 ++</b>	<b>EG 12+-</b>	<b>EG 10++</b>	<b>EG 10+-</b>
<b>Pou5f1 (Oct4)</b>	6,3	6,5	5,9	6	6,2	6	11,2	11	11,3	11	11,5	12,4	12,1	12	11,2	10,9	11,6	11,5
<b>Sox2</b>	2,4	2,3	1,6	1,9	1,7	2	8,8	8,7	8,4	8,7	8,4	7,7	9,1	8,5	8,2	7,4	8,6	7,7
<b>Klf4</b>	4,2	-	-	-	1,9	-	8,3	-	7,7	-	4,9	2,9	1,6	-	-	-	-	-
<b>c-Myc</b>	1,4	1,4	1,8	2,8	1,9	2	4,6	4,8	2,2	2,7	2,6	2,9	4,6	2,1	2,2	2,4	3,1	4,1
<b>Lin28</b>	2,9	3,2	3,7	2,6	1,8	2	9,2	9,2	8,1	8,3	8,8	9,2	7,6	7,9	9,3	9,7	9,6	9,8

**Tabla 6:** *Tabla que muestra los valores de cambio en escala log2 en la expresión de genes implicados en la generación de iPSC en las poblaciones celulares analizadas. Datos obtenidos a partir de los datos numéricos del Heat Map de los microarrays.*

El análisis reveló un bajo nivel de expresión de dichos genes en las hiEGL, los cuales codifican para factores de transcripción claves en el mantenimiento de la pluripotencialidad y autorrenovación de las células madre pluripotentes. La disminución en la expresión de Oct4 observada con respecto al resto de las poblaciones celulares fue moderada, manteniendo un nivel de expresión intermedio. Llama la atención también el bajo nivel de expresión del oncogen c-Myc en todas las poblaciones, puesto que cabría esperar una sobreexpresión de este gen en las poblaciones de células madre pluripotentes. La

inconsistencia de este resultado, junto con la falta de información obtenida por parte de la sonda para el gen *Klf4* en algunas de las poblaciones analizadas, dio pie a un estudio posterior de los niveles de proteína de ambos factores de transcripción en células hiEGL y en una línea de células pluripotentes EGCs.

Se estudiaron además otros genes relacionados con la pluripotencia de las células madre (Tabla 7). Los resultados del análisis de la expresión de estos genes en las células hiEGL fueron muy variados, por un lado genes como *Fbxo15*, *Gdf3*, *Stat3*, *Notch1*, *Cdh1* y *Nfkb1* se encontraron expresados al mismo nivel en hiEGL que en las poblaciones de las células pluripotentes, sin embargo otros genes como *Eras*, *Rex1* y *Fgf4* mostraban una acusada disminución en su nivel expresión.

Pluripotencia	EG hipox		PGC 1		PGC 2		ESCm		ESCf		Epi T9	Epi E3	PGC 11,5		EG 12 ++	EG 12+-	EG 10++	EG 10+-
<i>Ecat8</i> (Tdrd12)	9,2	9,2	9,5	9,4	9,3	9	9,7	9,7	10	9,9	4,9	4,9	9,6	9,8	9,2	8,5	9,2	9,2
<i>Dppa5</i> (Esg1)	14,1	14,3	12,7	13	12	12	14,5	14	14,3	14	9,4	8	13,7	14	13,7	13,2	13,8	13,6
<i>Dppa5</i> (Esg1)	11,6	11,6	9,9	9,9	9,1	9	14,4	15	14,4	14	9,4	8	13,8	14	13,8	13,2	13,9	13,8
<i>Dppa4</i>	12,7	12,7	12,6	13	12	12	11,8	12	11,5	12	5,7	5,3	12,5	13	11,2	10,7	11,9	11,9
<i>Dppa3</i> (Stella)	3,7	3,6	6,4	6,2	7,4	8	9,2	9	8,4	8,4	4,8	2,9	12,2	13	7,9	7,7	8,2	8,3
<i>Fbxo15</i>	11	11	10,1	10	9,7	10	11	11	11,4	11	7,1	5,4	9,8	9,7	10,3	9,6	10,4	10
<i>Eras</i>	6,7	6,7	1,9	2,4	2,1	3	9	8,9	9,3	8,8	8	9,6	1,4	1,2	7,7	7,7	8,6	8,3
<i>Gdf3</i>	10,7	10,5	9,1	8,9	8,6	9	10,1	10	10,4	11	8,3	8,7	8,5	8,8	9,3	8,7	10	9,9
<i>Sox15</i>	6,1	6,3	6,1	6,4	5,8	6	5,8	5,9	5,3	4,8	2,1	2,3	6	6,8	6,1	5,1	5,8	5
<i>Sall4</i>	12,6	12,7	12	12	11,8	12	11,8	12	11,6	12	11,4	11,4	11,1	11	11,2	11,3	11,4	11,4
<i>Zfp42</i> (rex1)	6,1	5,9	3,3	3,6	2,2	3	9	8,8	8,4	8,4	4,3	3,9	9,7	9,1	8,4	7,6	8,8	8,2
<i>Utf1</i>	8,9	9	7,5	7,6	7,6	8	10,2	10	9,3	9,3	8	10,4	10,8	11	9,8	10,1	10,4	10,6
<i>Tcf1</i>	6,9	6,8	6,1	6,2	6,3	6	5,7	6,1	7,9	7,5	1,2	1,8	8,9	8,5	4,7	3,9	5,2	4,3
<i>Ctnnb1</i> (β-cat)	9,9	9,7	7,5	7,3	8,8	9	10,3	10	10,1	10	9,5	9,2	8,8	9,1	10,2	10,1	9,8	9,8
<i>Stat3</i>	5	4,6	6,3	6,3	6,3	6	8,1	8,2	7,4	7,7	7,4	6,6	5,5	5,5	7,7	7,3	7,3	7,3
<i>Grb2</i>	4,9	5	4,8	5	5,3	5	3,8	3,9	4	3,8	1,8	3,6	6	4,9	3,9	4,3	4,1	4,5
<i>Dhx38</i>	11,2	11,2	11,2	11	11,2	11	9,4	9,4	9,2	9,2	9,8	10,1	10,2	10	9,3	9,5	9,5	9,7
<i>Wnt3a</i>	5,5	5,6	1,8	2,4	1,8	4	5,8	5,5	3,4	4	4,8	2,2	3,8	2,8	1,7	2	1,9	2,6
<i>Lifr</i>	2,5	3,6	3,2	1,2	2,6	2	2,8	3,8	4,3	2,4	2,9	1,7	1,3	1,2	3,5	2,1	3	3,1
<i>Notch1</i>	8,1	7,9	9,8	9,8	10,1	10	6,5	6,6	6,6	6,5	5	4,4	4,8	4,8	6,4	6,5	6,5	6,6
<i>Tcf3</i>	9,3	9,4	8	8	8,8	9	10	10	10,1	9,9	11	11	9,3	9,5	9,3	9,8	9,7	9,8
<i>Cdh1</i> (Cadherin1)	9,8	9,8	8,2	8,2	8,2	8	10,5	11	10,1	10	6,6	8,8	5,9	7,5	10,6	10,5	10,4	10,5
<i>Ifitm3</i> (Fragilis)	10,9	11	12,4	12	11,2	11	10,9	11	11,1	11	11	8,9	12	12	10,5	10,7	11,2	11,2
<i>Trp53</i> (p53)	8,3	8,2	8,6	8,6	7,5	8	10,4	11	10,4	10	10,3	10,3	10,8	10	9,6	9,5	10,3	10,1
<i>Pten</i>	3,3	2,9	1,6	2,3	2,8	3	7,4	7,7	6,8	7,3	5,3	5,5	4,7	4,3	6	6,4	6,4	6,6
<i>Fgf4</i>	3,2	3,4	1,5	2,1	2,2	2	7,8	7,6	7,8	8	2	4,4	1,3	1,5	7,9	6,7	8,3	7,2
<i>Gata2</i>	7,7	7,5	8,6	8,5	9,8	10	5,9	6,2	6,5	6,7	3	2	8,8	9,3	1,8	2,5	2,2	1,5
<i>Nfkb1</i>	7,6	7,7	-	-	8,2	8	6,8	7	5,8	6,2	7,2	7,8	5,4	5,7	-	-	-	-
<i>Gsk3b</i>	6,2	6	6,6	6,8	6,6	7	5,9	5,9	5,9	5,7	6,3	5,8	7,4	6,8	6,1	6	5,5	5,9

**Tabla 7:** Tabla que muestra los valores de cambio en una escala log2 en la expresión de genes asociados a pluripotencia en las poblaciones celulares analizadas. Datos obtenidos a partir de los datos numéricos del Heat Map de los microarrays.

En cuanto al estudio de los genes asociados al proceso de remodelación de la cromatina (Tabla 8) se observó una disminución de la expresión de prácticamente todos los genes relacionados con este proceso, con alguna excepción de genes en los que se observó un ligero aumento en su expresión como *Ehmt2*, *Dnmt3l*, o como en el caso del gen *Dnmt1* en el que su nivel de expresión no varía entre las poblaciones y se mantiene expresado a altos niveles.

Remodelación de cromatina	EG hipox		PGC 1		PGC 2		ESCm		ESCf		Epi T9	Epi E3	PGC 11,5		EG 12 ++	EG 12+-	EG 10++	EG 10+-
Ehmt2 (G9a)	8,7	8,7	9,5	9,5	9,4	10	9	9,1	8,5	8,5	8,1	7,9	8,5	8,4	7,9	7,9	7,8	8,1
Ehmt1 (Glp)	1,6	1,1	1,7	1,9	1,7	2	3,1	3,1	2,8	3,9	2,7	2,3	2,9	3,8	3,6	2,9	4,3	4,1
Dnmt3a	1,9	2,4	2	1,2	1,9	3	1,4	1,4	1,6	0,9	1,6	1,2	2,2	2,1	-	-	-	-
Dnmt3b	5,9	6,1	4,3	3,3	4,4	5	7,3	7,3	6,5	6,5	6,2	8,1	3	1,4	6,9	6,9	8,2	8,2
Dnmt3l	13,6	13,4	2,1	2,3	6,5	6	12,5	12	12,3	12	6,7	5,2	1,6	1,8	11,6	11,3	12,4	12,3
Dnmt1	10,5	10,5	9,7	9,8	9,4	9	9,5	9,7	9,5	9,6	8,5	8,6	9,3	9,6	9,8	9,6	9,5	9,6
Ezh2	3,3	3,5	2,2	2,3	3,1	2	10,5	11	9,8	10	10,3	9,8	10,5	11	9,7	9,4	9,6	8,9
Jmjd3	7,6	7,6	8,4	8,5	9	9	7,4	7,2	7,6	7,7	6,6	7,8	2,4	2,8	7,9	7,7	8	7,3
Cbx5	2,7	1,8	2,3	1,2	2	2	8,3	8,3	8,2	7,9	8	8	8,5	8,5	8,5	8,2	8,5	8,1
Ing3	1,3	1,3	2	1,1	2,2	2	6,7	6,6	6,1	6,4	6,6	6,7	7,2	7,1	6,2	5,9	6,8	6,3
Uhrf1	1,4	1,4	1,1	1,7	1,5	1	5,9	5,2	5,4	5,6	4,9	4,3	2,3	1,6	6,5	5,4	7	6,4
Dek	5,2	5,7	5,5	5,1	2,6	4	9,8	9,8	9,7	9,8	7,9	7,9	7,8	7,2	9	8,9	9	9
Hmgb2	4,6	4,4	3,3	3,1	2,9	3	10,8	11	10,6	11	10,9	10,9	11,4	12	11,5	11,5	11,7	11,3
Nasp	4,9	5	2,9	2,7	2,7	3	11,1	11	10,7	11	10,6	10,6	10,1	9,9	10,3	9,8	10,6	10,3
Nfatc3	2,2	1,6	1,4	1,8	2,8	2	6	6,2	6,3	6	5,8	5,7	7,9	7,8	6	5,4	5,4	5,5
Prmt5	2,9	2,1	2,4	2,6	2,9	3	7,8	8,1	7,7	7,8	8,2	8,2	8,4	9,4	7	8,6	8,2	9,1
Rnf4	3	2,8	3,9	3	5,1	5	7,9	7,9	7,8	7,9	8,6	8,5	8,5	9,1	8,6	8,2	8,7	8,6
Shmt2	2,3	1,9	1,3	1,4	1,4	2	6,4	6,6	6,9	7,3	7,9	7,6	7,1	6,4	7,8	7,4	8	7,6
Smarcc1	2,4	1,4	1,9	1,6	1,4	1	9	9	8,5	8,5	8,6	8,1	8,8	8,4	8	7,7	8,8	8,7
Smc1a	3	1,8	1,4	1,5	1,5	1	6,3	6	7,1	6,9	7,5	6,5	5,9	7	6,7	6,3	6,1	6,3
Tdrd3	1	1,4	1,2	1,7	1,5	1	5,2	5,6	5,5	5,2	6,5	5,8	6,6	6,3	4	3,3	5	4,5
Tgif1	1,5	1,6	2,9	1,6	1,4	1	7,3	7,3	6,4	6,4	8,2	7,6	2,6	5,3	7,9	7,9	8	7,5
Tle4	1,5	0,9	2	2,2	2	1	6,1	6	5,7	6,3	4,2	4,5	4	5,8	4,6	3,8	5,9	5,1
Actb	2,3	1,7	1,9	2,3	1,6	2	11,7	12	11,6	12	12	11,5	12,4	11	11,6	11,8	11,9	11,7
Aebp2	1,5	1,8	2,4	2,2	1,6	2	6,9	6,8	6,4	6,9	6,3	6,1	5,5	6,6	6	5,1	6,5	5,6
Max	1,7	1	1,6	1,4	3	2	6,4	5,9	5,7	5,3	5	5,5	6,7	6,5	5,4	4,1	6,2	6
Ppp1ca	4,5	4,8	4,4	4,4	4,2	5	11,4	11	11,3	11	12,3	12,2	12,3	12	11,6	11,7	11,8	11,7
Ppp1cc	1,5	1,9	1,8	1,5	1	2	7,4	7,1	7	6,9	6,4	6,9	8,1	7,8	6,5	6,6	7,4	6,8
Rbbp7	2,5	2,6	2,3	2,2	3,4	3	9,7	9,8	9,9	10	11,5	10,8	10,5	11	10,3	10,2	10,6	10,1
Rbbp7	2,6	2,2	1,7	2	1,4	2	9,5	9,5	9,7	9,9	11	10,5	10,2	10	10	10	10,4	9,9
Ruvbl1	4	4,5	4,3	4,6	5,1	3	9,5	9,6	9,4	9,6	9,2	9	9,4	9,7	9,2	8,8	9,8	9,4
Taf9	4,5	4,2	4,3	4,3	4,7	5	9,3	9,4	9,3	9,2	7,6	7,7	6,1	7,4	9	8,9	9,2	9

**Tabla 8:** Tabla que muestra los valores de cambio en una escala log2 en la expresión de genes asociados al proceso de remodelación de la cromatina en las poblaciones celulares analizadas. Datos obtenidos a partir de los datos numéricos del Heat Map de los microarrays.

### 3. Análisis del mecanismo de inducción de pluripotencialidad de las hiEGL por hipoxia

#### 3.1. Estudio del principal sistema molecular de respuesta a hipoxia : HIF's

##### 3.1.1. Análisis por Microarrays de HIF y genes relacionados con HIF en hiEGL

El factor de transcripción HIF-1 $\alpha$  y los genes activados por él, constituyen una de las principales vías de señalización celular activadas por hipoxia. A partir de los datos numéricos obtenidos del *Heat map* de los *microarrays* se analizaron los niveles de expresión del gen HIF1 $\alpha$  y algunos genes involucrados en su vía de señalización celular. Las células en hipoxia cambian su metabolismo dependiente de oxígeno. En condiciones de normoxia, el O<sub>2</sub> sirve como aceptor de electrones y la energía se genera a través de la fosforilación oxidativa, mientras que en hipoxia se produce cambio metabólico en las células hacia la glucólisis anaerobia, este cambio promueve una bajada del pH intracelular así como la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS). HIF-1 $\alpha$  guía este cambio metabólico promoviendo la expresión de genes relacionados con la glucólisis y con el mantenimiento de la homeostasis redox. A continuación se muestra una tabla en la que se detallan

los genes relacionados con este proceso diferencialmente expresados en las distintas poblaciones celulares analizadas.

HIF & Metabolismo	EG hipox		PGC 1		PGC 2		ESCm		ESCf		Epi T9	Epi E3	PGC 11,5		EG 12 ++	EG 12+-	EG 10++	EG 10+-
Hif1a	2	2,2	2	1,6	1,2	3	6,3	6,3	5,8	6	6	5,3	5,9	6,6	5,6	5,7	6,3	6,1
Egln1 (PH2)	2,2	1,9	2,2	1,7	2,2	2	2,2	2,7	1,5	3	5,2	4,7	2	2,2	3,6	5,4	3,3	2,6
Hk1	2,2	2,2	2,6	2,4	2,7	2	3,8	3,7	4,4	4,3	3,9	4	5	5,4	5,7	4,9	5	4,2
Eno1	11,4	11,5	11	11	11,3	11	13,1	13	12,9	13	14,3	13,9	12,7	13	13,1	13,4	12,9	12,9
Eno2	8,4	8,3	11,5	11	12,3	13	3,4	3,7	4,4	3,7	6,2	7,1	4,4	1,9	5,1	5,4	2,6	4,7
Slc2a1 (Glut1)	10,6	10,7	10,8	11	11	11	11,3	11	11,3	11	13,1	12,4	8,9	8,8	12,2	12,4	10,9	10,8
Slc2a3 (Glut3)	12,5	12,7	11	11	11,3	11	12,3	12	12,3	12	12,7	12,1	10	9,6	12,7	12,8	11,1	10,9
Slc4a8	9,5	9,6	7,6	7,6	7,3	8	4,9	5,4	5,1	5,3	4	4,8	4,2	3,1	5,9	5,2	4,9	5,1

**Tabla 9:** Tabla obtenida a partir de los datos de microarrays de los niveles de expresión de genes implicados en la vía de señalización de HIFs y en el metabolismo celular en las poblaciones celulares analizadas.

### 3.1.2. Detección de la proteína HIF-1α en PGCs

Una vez demostrada la presencia del transcrito de HIF1 por *microarrays*, se procedió a detectar los niveles de proteína de HIF1-α mediante inmunofluorescencia en PGCs en dicha condición. En primer lugar, se llevó a cabo la validación del anticuerpo y puesta a punto de la técnica en la línea celular Cos7, en la cual ya se ha descrito previamente la expresión de HIF-1α bajo condiciones de hipoxia y bajo el tratamiento con CoCl<sub>2</sub>, que induce una hipoxia química. A continuación se realizó la inmunofluorescencia en PGC cultivadas en normoxia y en hipoxia durante 8 horas. Los resultados muestran la expresión de HIF-1α en el núcleo tanto en las Cos7 cultivadas en hipoxia como con CoCl<sub>2</sub> (Figra 20), así como en PGCs únicamente cuando fueron cultivadas en condiciones de hipoxia (Figura 21).

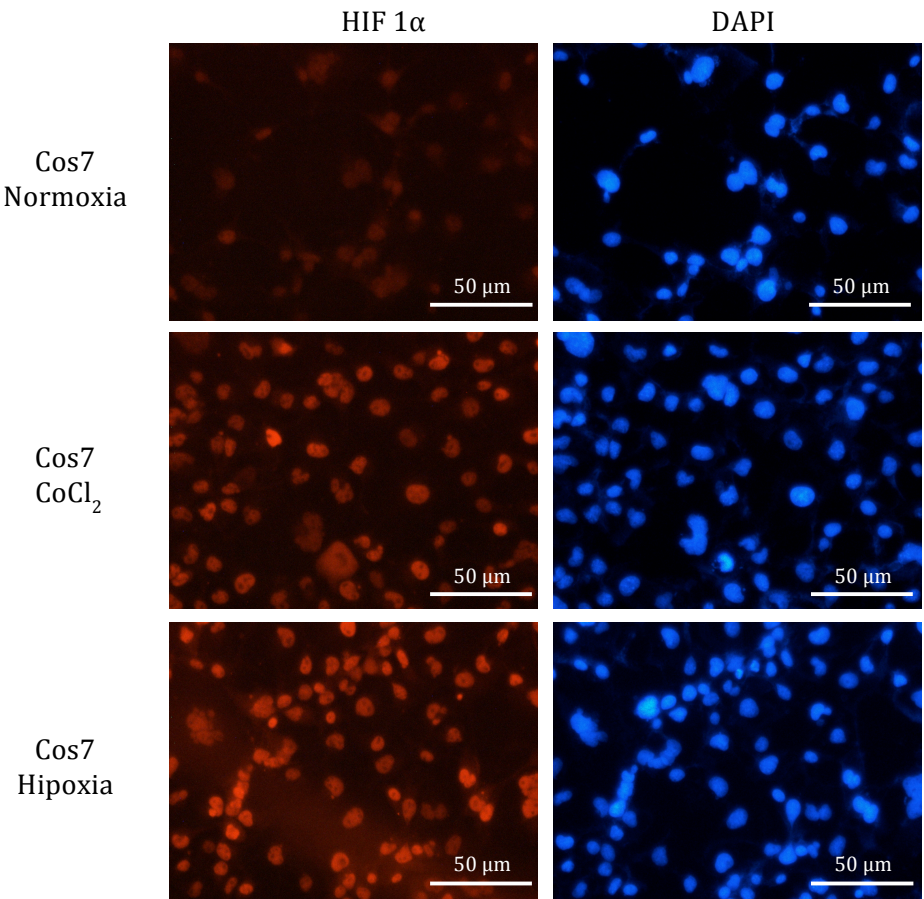


Figura 20: Inmunofluorescencia frente a HIF-1 $\alpha$  en células Cos7 cultivadas 4 horas bajo condiciones de normoxia, hipoxia y CoCl<sub>2</sub>. Se observa un aumento significativo en condiciones de hipoxia. En la columna de la derecha, contratinción nuclear con DAPI.

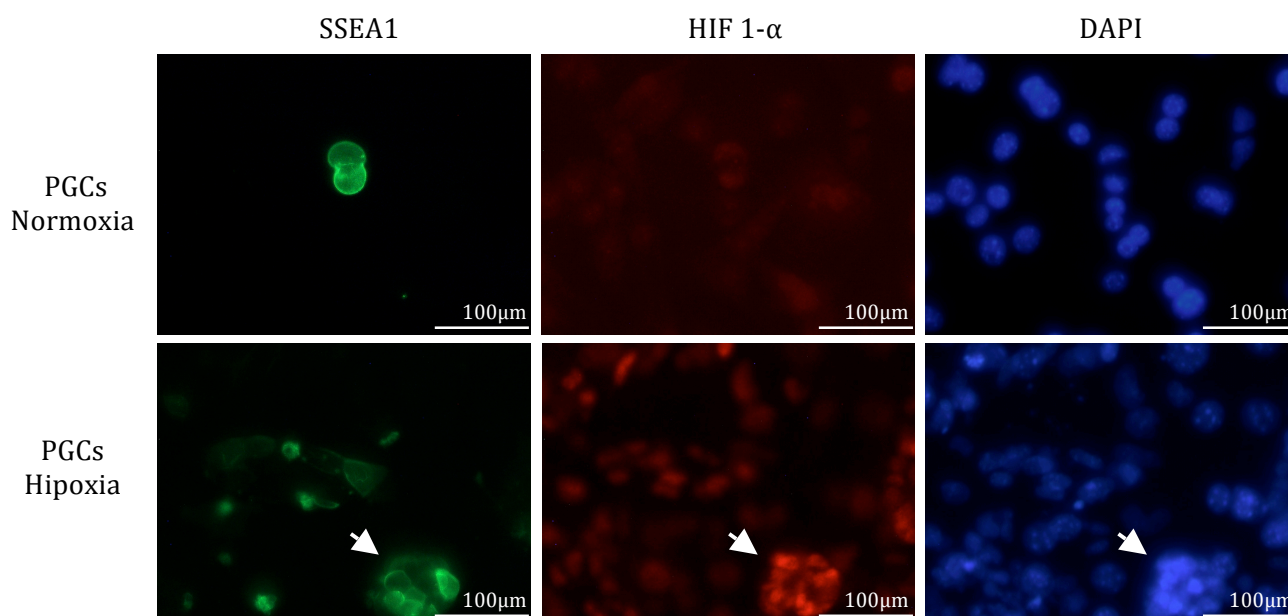


Figura 21: Inmunofluorescencia frente a HIF-1 $\alpha$  que muestra la expresión nuclear de esta proteína en PGCs identificadas en verde con anti-SSEA1, cultivadas bajo condiciones de hipoxia durante 8 horas. La flecha señala un grupo de PGCs positivas para HIF-1 $\alpha$ .

### 3.1.3. Estudio funcional de la implicación de HIFs en la inducción de pluripotencialidad de hiEGL.

La inducción de la expresión de HIFs es el mayor responsable de la respuesta celular a hipoxia. Para confirmar funcionalmente que la hipoxia induce pluripotencialidad en las PGC a través de la expresión de HIF se utilizaron tres fármacos, Mitramicina, DMOG y un inhibidor de la traducción de HIF-2 $\alpha$ . Se realizaron varios experimentos en los que se cultivaron las PGC tanto en normoxia como en hipoxia. En el tratamiento con Mitramicina, un inhibidor farmacológico de HIF, no se observó efecto alguno sobre el crecimiento de las PGC en los cultivos en normoxia tal y como se esperaba. Por el contrario, en los cultivos en hipoxia los efectos positivos sobre el crecimiento de las PGCs promovidos por la hipoxia fueron eliminados (Figura 22A). De igual modo, el tratamiento con Mitramicina afectó significativamente a la inducción de pluripotencialidad, disminuyendo significativamente el número de colonias EGCs en hipoxia pero no así en normoxia (Figura 22B).

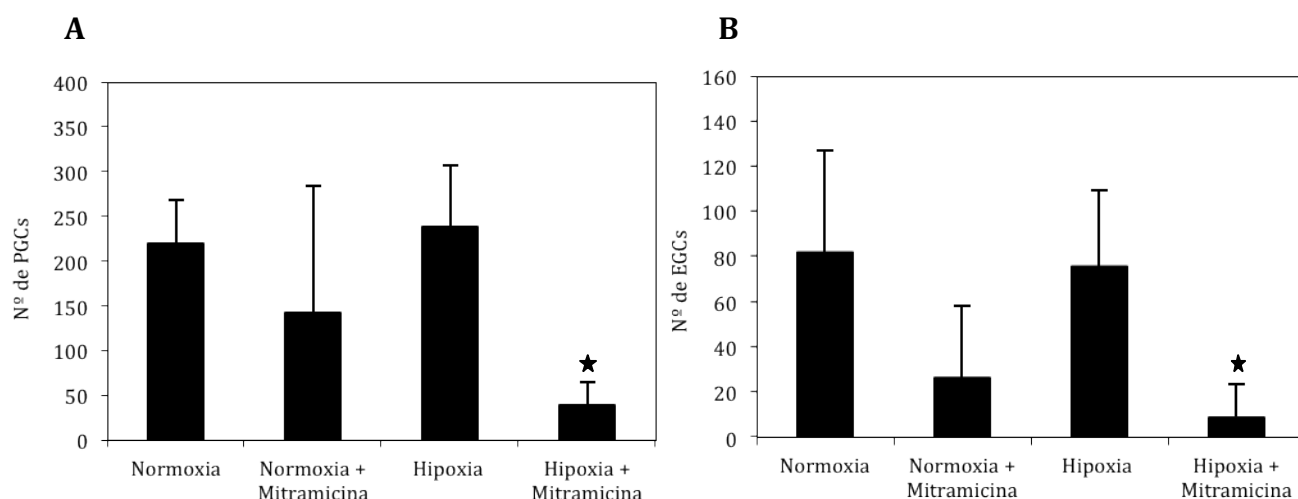


Figura 22: El tratamiento con Mitramicina afectó significativamente tanto a la proliferación (A) como a la inducción de pluripotencialidad de las PGC en hipoxia (B). Los resultados corresponden a un experimento significativo. (La estrella designa una diferencia significativa según el test estadístico *t*-Student, con un valor de  $p \leq 0,05$ ).

Asimismo, se realizaron experimentos en los cuales se trataron las PGC en normoxia con DMOG, un inhibidor de la degradación de HIF. DMOG es un inhibidor de la prolin- hidroxilasa (PAH), la cual regula post-transcripcionalmente los niveles de proteína de la subunidad HIF $\alpha$ . La supresión de la actividad de PAH conduce a un incremento de los niveles endógenos de HIF $\alpha$ . Dicho tratamiento indujo un número similar de EGCs en condiciones de normoxia, mimetizando el efecto que produce la hipoxia en la reprogramación de las PGCs (Figura 23).

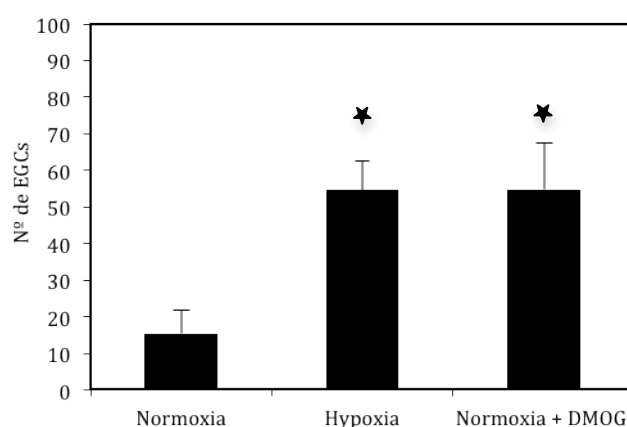


Figura 23: El tratamiento con DMOG en normoxia indujo un número similar al de EGCs en hipoxia. Los resultados corresponden a un experimento significativo. (La estrella designa una diferencia significativa según el test estadístico *t*-Student, con un valor de  $p \leq 0,05$ )



Por último, el tratamiento con el Inhibidor de la traducción específico de HIF-2 $\alpha$  en hipoxia tuvo un efecto positivo tanto en la proliferación de las PGCs (Figura 24A) como en el número de EGCs con respecto a normoxia (Figura 24B) aunque ambos incrementos no fueron estadísticamente significativos.

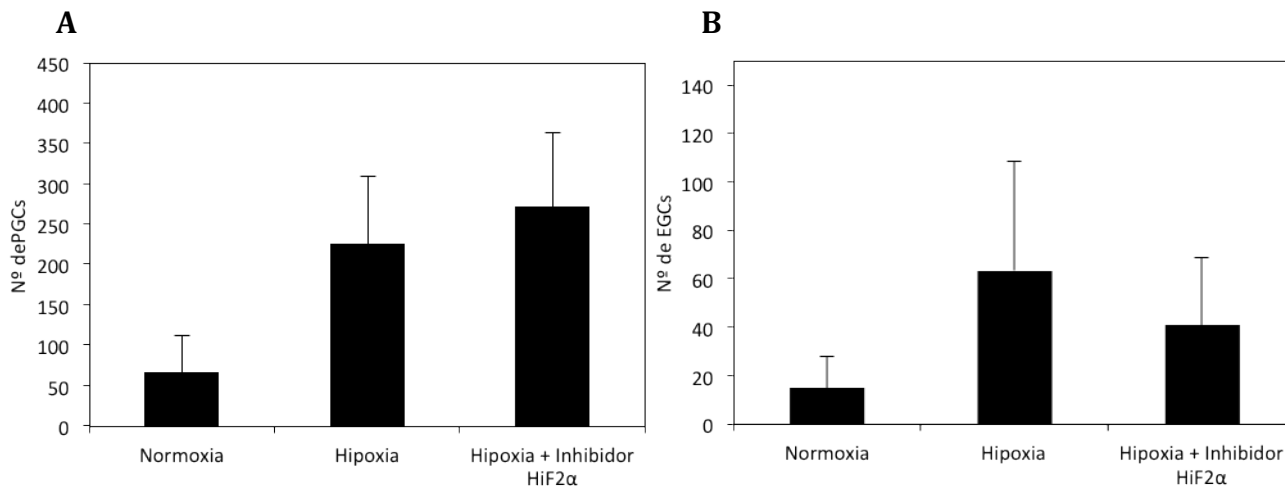


Figura 24: El tratamiento con un inhibidor de la traducción de HIF-2 $\alpha$  en hipoxia incrementó, aunque no de forma significativa, tanto la proliferación de las PGCs (A) como la inducción del número de EGCs con respecto al control de normoxia (B).

En conclusión, el conjunto de estos experimentos involucran a HIF-1 $\alpha$  como el responsable de la inducción de potencialidad en PGCs mediada por la hipoxia.

### 3.2. Estudio del principal inductor de reprogramación celular: Oct4

#### 3.2.1 Análisis por Citometría de Flujo de la expresión de Oct4 en hiEGL

El gen Oct4 es el principal responsable de la pluripotencialidad en las células madre. Oct4 está regulado por multitud de vías de señalización celular entre las que se encuentra la cascada de señalización de los factores HIFs. Mediante citometría de flujo se estudió el efecto de la hipoxia en la expresión de Oct-4 de las hiEGL. Este gen se expresa tanto en PGCs como en EGCs aunque a diferentes niveles. El objetivo era observar cambios en la expresión de Oct4 en las PGCs durante el proceso de inducción de pluripotencialidad por hipoxia que pudieran ayudar a explicar el mecanismo celular implicado. La siguiente figura muestra las gráficas obtenidas para cada una de las condiciones experimentales: el control negativo lo constituye las células nutricias STO, negativas para Oct4-GFP y SSEA1 y las otras dos condiciones son PGCs, positivas para Oct-GFP y SSEA1, cultivadas 4 días tanto en normoxia como en hipoxia. Se observó que, a los 4 días en cultivo, las PGC en normoxia expresaban Oct4-GFP de forma homogénea, mientras que en hipoxia la expresión del transgen Oct4-GFP se muestra más heterogénea, provocando una mayor variación en la expresión de Oct4 en PGC.



Este aumento de heterogeneidad demostró ser estadísticamente significativo según el test estadístico F-Snedecor (Figura 25).

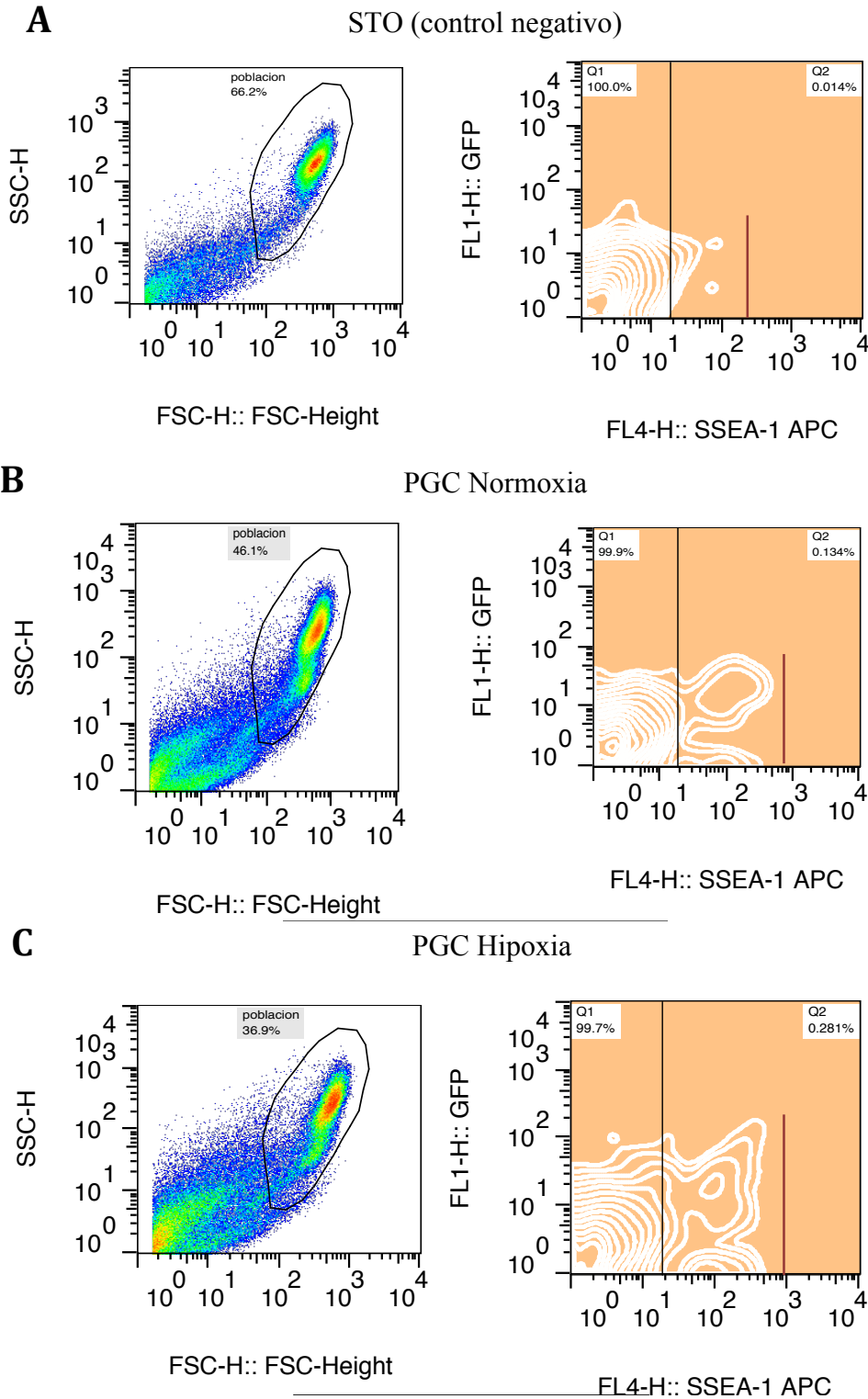


Figura 25: Gráficas de densidad (izquierda) y gráficas de contorno con transformada logarítmica (derecha) obtenidas por citometría de flujo frente a SSEA1 y Oct4-GFP. (A) Células STO cultivadas durante 4 días. (B) PGC cultivadas durante 4 días en normoxia. (C) PGC cultivadas durante 4 días en hipoxia. Se puede observar en las gráficas de contorno una mayor heterogeneidad de la expresión de Oct4-GFP en las PGC (células positivas para SSEA1) en hipoxia (barra).

### 3.2.2. Cinética de la expresión de Oct-4 durante el proceso reprogramación celular de PGCs

Tras detectarse variaciones en la expresión de Oct4 en PGCs en hipoxia, se decidió estudiar de forma más exhaustiva la relación entre la expresión del gen Oct4 y la formación de colonias hiEGL durante el proceso de reprogramación de las PGCs en hipoxia. Para ello se llevaron a cabo varios experimentos en placas de cultivo Terasaki de 384 pocillos en los que se sembró una célula PGC por pocillo y se monitorizó la expresión del transgen Oct4-GFP cada día durante 6 días en condiciones hipóxicas.

Transcurrido este tiempo se procedió a observar la presencia de colonias fosfatasa alcalina positivas en cada uno de los pocillos. Estos experimentos nos permitieron además comprobar que la formación de colonias ocurre a partir de una sola PGC, y no como resultado del efecto de la agregación de PGC migratorias en el cultivo.

#### 3.2.2.1. Evolución de la expresión de Oct-4 GFP en pocillos con hiEGLs

En la siguiente figura (Figura 26) se muestra la evolución de la expresión del transgen Oct4 en los pocillos en los que se detectó señal GFP. Principalmente se observó que la tendencia fue la aparición de varias intensidades de fluorescencia GFP a partir del segundo o tercer día de cultivo. En un bajo número de pocillos dicha fluorescencia se mantuvo constante hasta el sexto día, sin embargo en la mayoría de los pocillos la tendencia general observada fue el mantenimiento de fluorescencia alrededor de uno a dos días seguidos, pudiendo aparecer esta de forma temprana o más tardía en el cultivo celular.

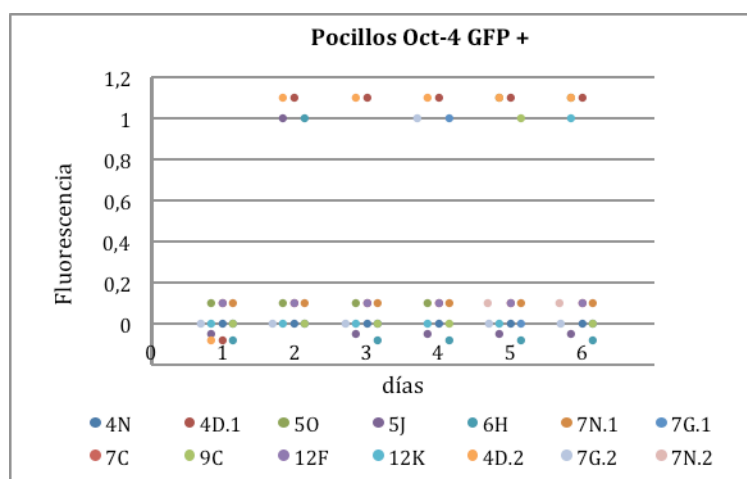


Figura 26: Evolución cinética de la expresión de Oct4-GFP en las células PGCs durante el proceso de reprogramación. Cada pocillo donde se ha reprogramado una PGC a células hiEGL tiene asignado un color y una clave número-letra. Se toma como valor 0 y 1 en el eje vertical, la ausencia de fluorescencia GFP y presencia de fluorescencia GFP, respectivamente.

### 3.2.2.2. Estabilidad en la expresión de Oct4 en hiEGLs.

Posteriormente se evaluó la estabilidad en la expresión del transgen Oct4-GFP a lo largo del proceso de reprogramación de PGCs a hiEGL. Para ello se monitorizó la expresión de Oct4-GFP en los pocillos en los que se obtuvieron colonias de células hiEGL identificadas posteriormente por tinción con fosfatasa alcalina. Como se puede apreciar en la gráfica (Figura 27), sólo dos de las colonias obtenidas en el experimento mostrado, demostraron una expresión de Oct4-GPF constante en el proceso. Nótese también, la ausencia de expresión del transgen durante todo el proceso en algunas de las colonias de hiEGL obtenidas.

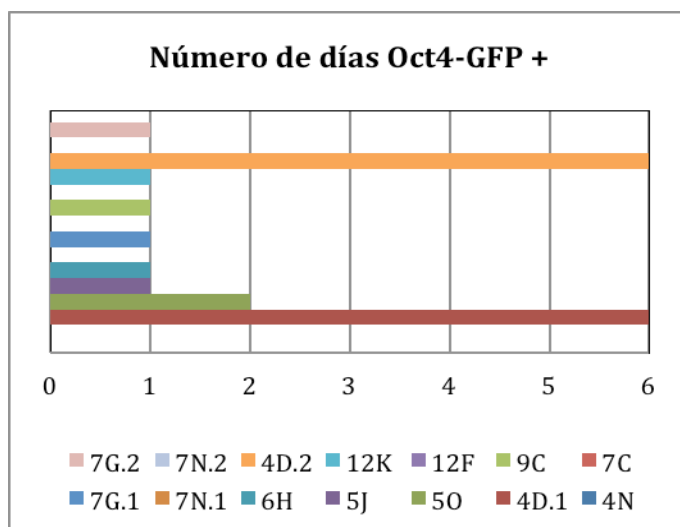


Figura 27: Gráfica en la que se cuantifica el tiempo de expresión del transgen Oct4-GFP en colonias hiEGL en un experimento representativo. Cada pocillo donde se ha reprogramado una PGC a una colonia hiEGL tiene asignado un color y se ha representado el número de días totales que han sido Oct4-GFP positivas.

A modo de resumen, la siguiente figura (Figura 28) muestra una gráfica obtenida a partir de varios experimentos donde se diferencian por porcentajes el número de colonias hiEGL. El 100% constituye el número total de colonias hiEGL fosfatasa alcalina positivas obtenidas. El 57% de las colonias hiEGL no mostraron fluorescencia GFP observable durante todo el proceso de reprogramación, el 43% mostraron fluorescencia GFP en algún momento del proceso y por último, el 14,3% mostraron una fluorescencia constante.

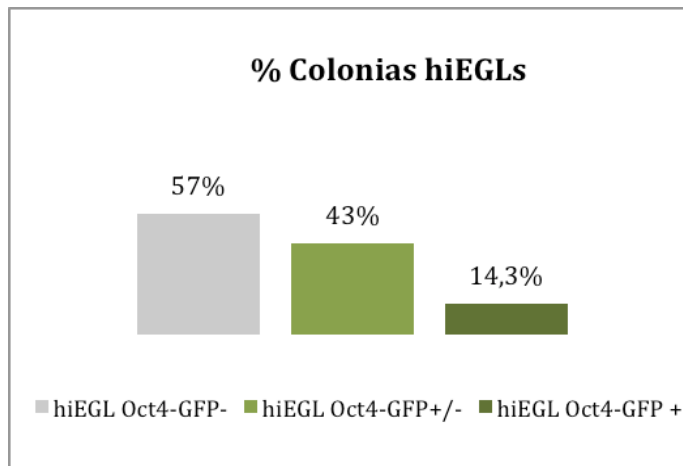


Figura 28: Resumen de la expresión de Oct4-GFP en las colonias hiEGL. hiEGL Oct4-GFP-: colonias que no han mostrado GFP; hiEGL Oct4-GFP+/- : colonias que han mostrado GFP en algún momento; hiEGL Oct4-GFP+: colonias que han mostrado GFP de manera constante.

### 3.2.2.3. Eficiencia de la inducción de pluripotencialidad en PGC por hipoxia

A partir de los datos obtenidos de los experimentos realizados en las placas de cultivo Terasaki, se calculó la eficiencia de la inducción de pluripotencialidad en PGCs en hipoxia. El resultado de los experimentos reveló que la media del porcentaje de reprogramación de PGCs a hiEGL en hipoxia fue de aproximadamente un 10%.

### 3.2.2.4. Cuantificación de la expresión Oct4-GFP en la población de hiEGL reprogramada.

Por último, se realizó una cuantificación de la intensidad de expresión del transgen Oct4-GFP durante cada día en el cultivo. Mediante el uso del microscopio de fluorescencia se pudieron apreciar dos intensidades de fluorescencia, una alta, la cual correspondería a una elevada expresión del transgen Oct4-GFP y otra más tenue, que correspondería con bajos niveles de expresión. Como podemos ver en la figura (Figura 29), sorprendentemente la mayor parte de la población de células hiEGL reprogramadas procedieron de PGCs con un bajo o nulo nivel de expresión de Oct4-GFP.

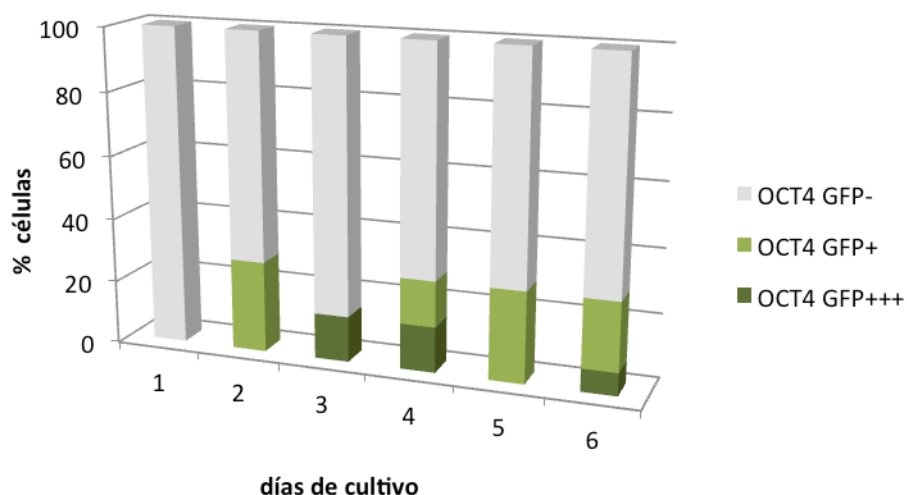


Figura 29: Porcentaje de células que han expresado Oct4-GFP en cada uno de los 6 días de cultivo. Oct4 GFP-: ausencia de fluorescencia visible GFP; Oct4 GFP+: intensidad de fluorescencia GFP media y Oct4 GFP+++: intensidad de fluorescencia GFP muy elevada.

### 3.2.3. Detección de Oct4 endógeno en hiEGL mediante inmunofluorescencia

Puesto que la exposición de PGC a condiciones de hipoxia dio lugar a una desregulación del transgen Oct4-GFP, y teniendo en cuenta que muchas de las colonias de células hiEGL obtenidas provenían de PGCs en las cuales la detección de los niveles de expresión de dicho transgen era muy baja e incluso no visible con microscopía durante el proceso de reprogramación celular, se procedió a comprobar mediante inmunofluorescencia los niveles de proteína Oct4 endógenos en PGCs. Es importante mencionar que la fluorescencia del transgen Oct4-GFP fue monitorizada con un microscopio de fluorescencia (a unos aumento de 200X y 400x) y con la ayuda de una cámara fotográfica, con la que se tomaron fotografías con un tiempo de exposición aproximado de 1 segundo. Es posible pensar que a un mayor aumento y a mayor tiempo de exposición se hubiera podido detectar un nivel umbral de fluorescencia más baja en las PGCs, por tanto, en el estudio expuesto anteriormente sólo se pudo valorar una expresión bastante alta del transgen Oct4-GFP. Por esta razón, la no detección de éste en los experimentos de monitorización del transgen no implica la ausencia total de la proteína Oct4 en dichas células. La siguiente figura (Figura 30) muestra la detección de la proteína Oct4 tanto en líneas celulares pluripotentes mESC E14t, mEGC TGC-10 como en PGCs bajo condiciones de normoxia (+bFGF) e hipoxia.

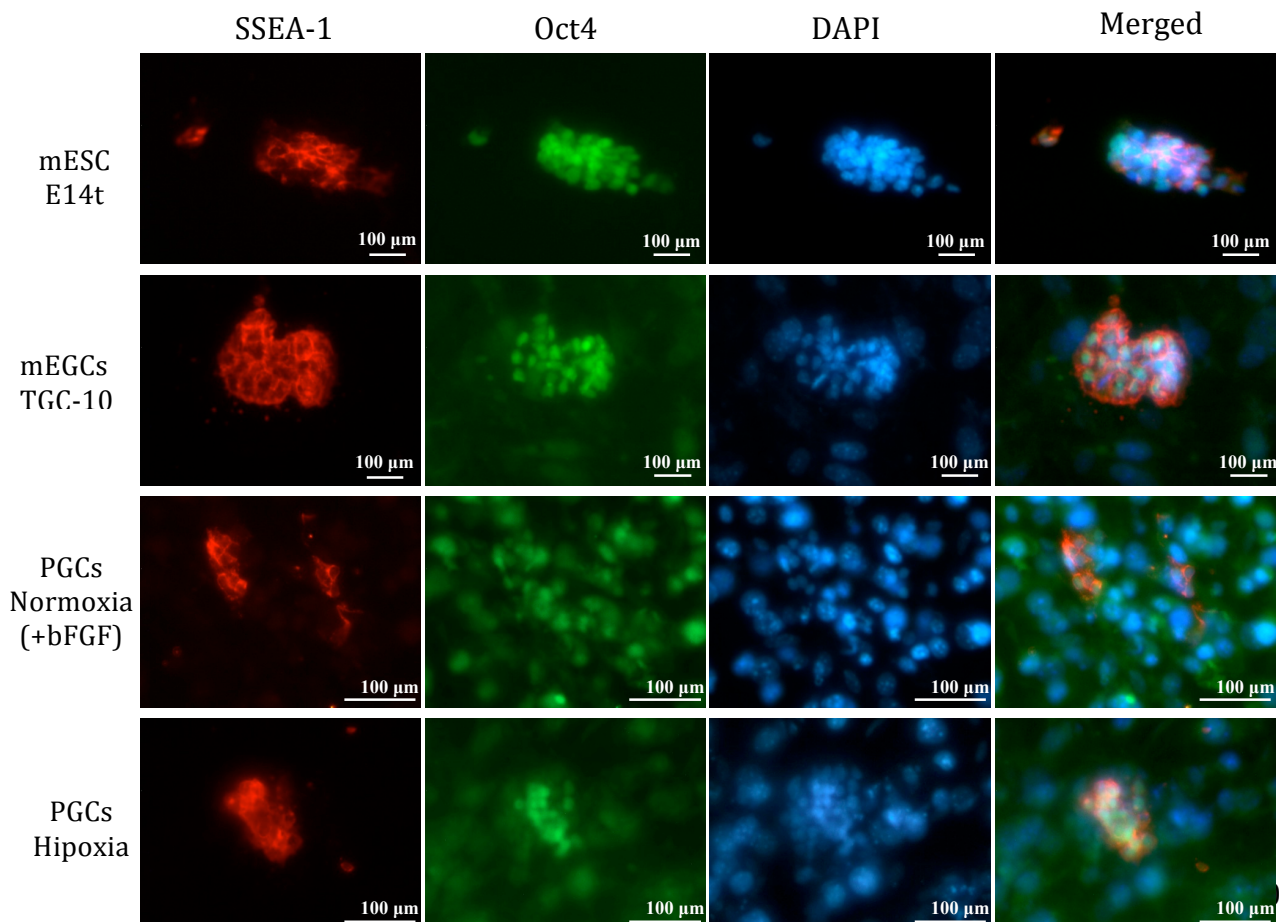


Figura 30: *Inmunofluorescencia frente al marcador de pluripotencia Oct4. Como control positivo se utilizaron células ESC de la línea E14t y células EGC de la línea TGC-10, ambas de ratón. Tanto las PGC en normoxia (en presencia de bFGF) como en hipoxia, como las colonias obtenidas de PGC en ambas condiciones resultaron positivas para este marcador en el núcleo. (Merge: superposición de imágenes).*

#### 4. Estudio de otros mecanismos inducidos por la hipoxia en las PGCs

##### 4.1. Análisis cuantitativo de la expresión génica de PPAR $\gamma$ y Bnip3 en PGCs en hipoxia por RT-qPCR

La adaptación a los bajos niveles de oxígeno producidos por la hipoxia provoca en las células un cambio metabólico el cual conduce a la disminución de los niveles de producción de ATP por la baja actividad de la cadena de transporte electrónico e induce un incremento de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) por parte de la mitocondria. Se ha descrito que HIF-1 media la respuesta adaptativa a estos cambios producidos en la célula, uniéndose a los promotores de genes que modulan el metabolismo y activando su transcripción. Según algunos autores, HIF-1 es considerado el mayor actor en la supervivencia celular como respuesta a hipoxia, mientras que otros asocian la activación de HIF-1 por hipoxia a la muerte celular en algunos tipos celulares. Con el fin de profundizar en estos mecanismos asociados a HIF-1 en PGCs sometidas a hipoxia, éstas se cultivaron durante 48 horas en normoxia e hipoxia, se aisló el mRNA de ambas poblaciones y se analizó la expresión mediante RT-qPCR de dos genes, PPAR $\gamma$  y Bnip3. Ambos genes están regulados por HIF-1 y se relacionan con procesos de supervivencia y apoptosis celular en condiciones de hipoxia. La siguiente gráfica (Figura 31) muestra la elevada expresión inducida por la hipoxia de ambos genes en PGCs sometidas a hipoxia.

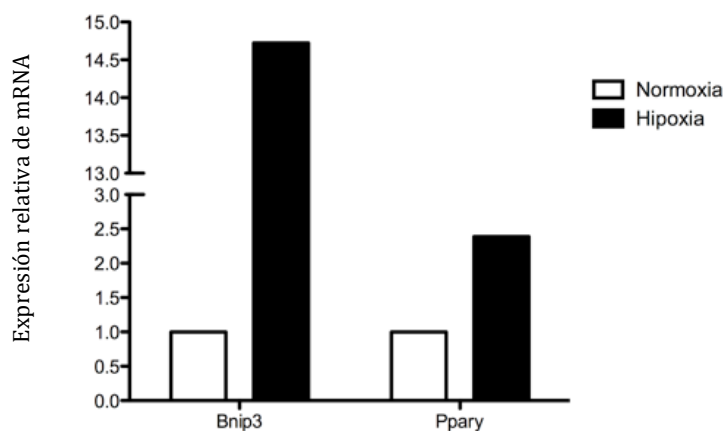


Figura 31: *Comparación de los niveles de expresión de Bnip3 y PPAR $\gamma$  por RT-qPCR en PGCs en hipoxia normalizados con respecto a normoxia.*

#### 4.2. Estudio funcional de la implicación de PPAR $\gamma$ en la inducción de pluripotencialidad de hiEGL

El gen PPAR $\gamma$  codifica para una proteína receptora denominada “*peroxisome proliferator-activated receptor gamma*”. Este receptor PPAR $\gamma$  puede actuar como factor de transcripción asociándose a receptores citoplasmáticos y mediando la actividad transcripcional de varios genes. Dado el gran aumento de la expresión de dicho gen que detectamos en las PGCs en hipoxia, se decidió comprobar mediante el uso de un activador farmacológico de la proteína PPAR $\gamma$  una posible implicación de este factor de transcripción en el aumento de la proliferación y/o adquisición de pluripotencialidad de las PGCs observados en condiciones de hipoxia. Para ello se realizaron varios experimentos en los que se expuso el cultivo de PGCs durante 7 días a distintas concentraciones de un agonista de PPAR $\gamma$ , denominado Ciglitazone en condiciones de normoxia. Los resultados revelaron que ninguna de las concentraciones del fármaco afectaban significativamente a los procesos de proliferación y adquisición de pluripotencialidad las PGCs (Figura 32).

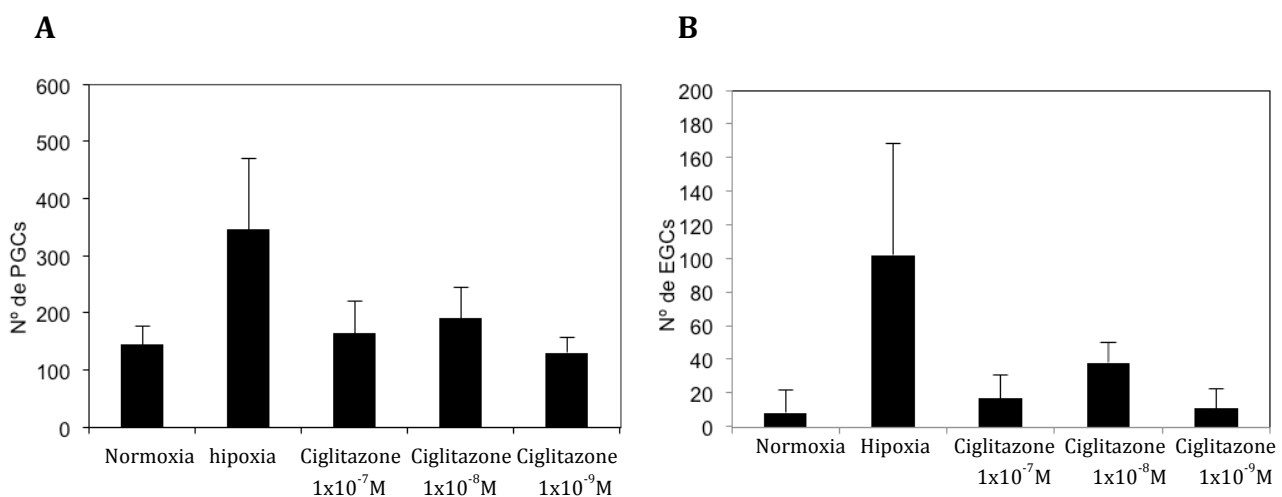


Figura 32: Tratamiento con diferentes concentraciones del agonista de PPAR $\gamma$ , Ciglitazone, a los cultivos de PGCs. Dicho tratamiento no afectó de forma significativa a la proliferación de las PGCs (A), así como tampoco a la formación de EGCs (B). Los resultados corresponden a uno de los experimentos realizados por triplicado.

#### 4.3. Papel de la sobreexpresión de Bnip3 en hipoxia: estudio morfológico de las hiEGL a través de Microscopía electrónica

Bnip3 codifica para una proteína con función proapoptótica y está implicada en procesos de autofagia y mitofagia (autofagia mitocondrial). Debido al aumento de la expresión de Bnip3 en condiciones hipóxicas detectado por RT-qPCR, y para determinar si estos procesos se estaban llevando a cabo en las PGCs cultivadas en hipoxia, se cultivaron PGCs durante 6 días en hipoxia y en las condiciones control: normoxia y normoxia + bFGF, y posteriormente fueron fijadas y se



observaron al microscopio electrónico. La siguiente figura (Figura 33) muestra las micrografías electrónicas tomadas de las células nutricias STO en condiciones de normoxia e hipoxia y de PGCs en las condiciones de normoxia, normoxia + bFGF e hipoxia. Sólo en las condiciones de hipoxia se detectaron algunas células hiEGL en las que claramente se estaba dando procesos de autofagia y mitofagia celular.

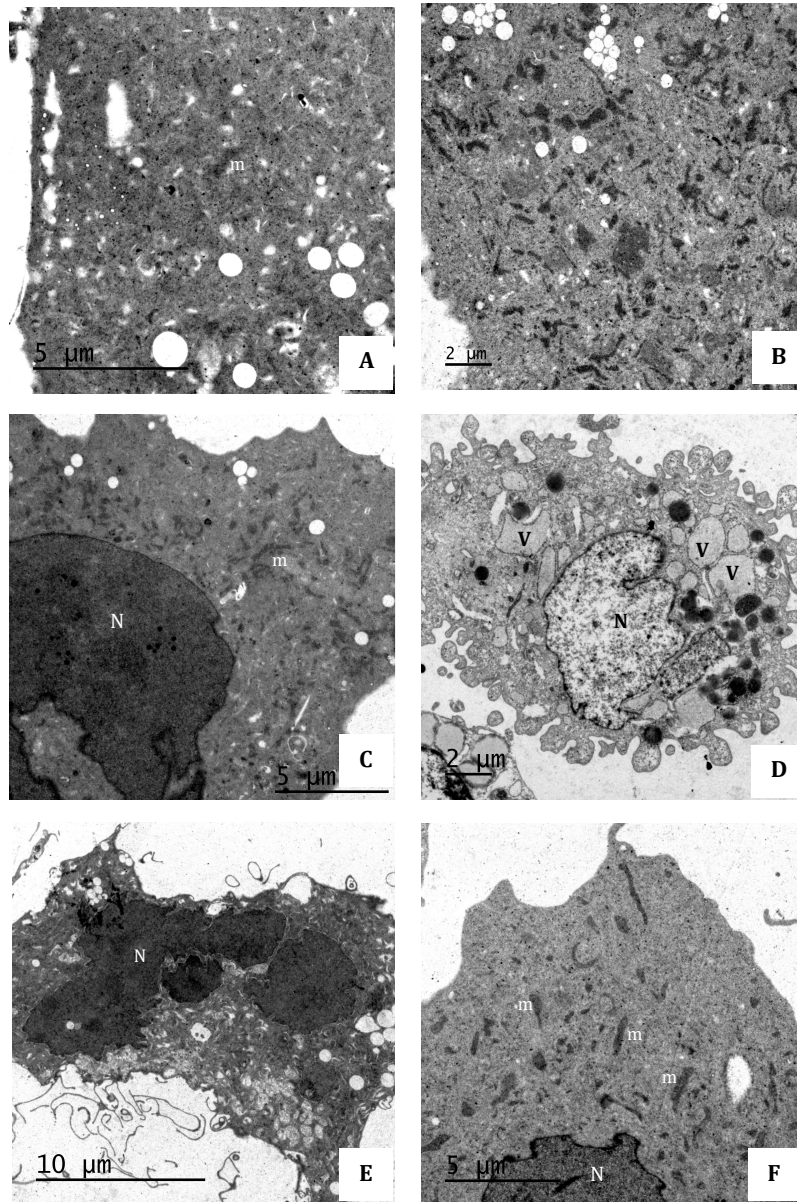


Figura 33: Micrografías electrónicas de células PGCs y STO. **(A)** Citoplasma de STO cultivada en normoxia; **(B)** Citoplasma de STO cultivada en hipoxia, no se aprecian diferencias morfológicas destacables; **(C)** hiEGL cultivada en hipoxia; **(D)** hiEGL cultivada en hipoxia y con características de células autofágica (numerosas vacuolas autofágicas en el citoplasma); **(E)** PGC cultivada en normoxia; **(F)** PGC cultivada en normoxia + bFGF. Núcleo celular (N); mitocondrias (m) y vacuolas autofágicas (V).



## *Discusión*

---

## 1. Hipoxia en la inducción de potencialidad en células diferenciadas

En el presente estudio se obtuvieron células pluripotentes a partir de PGCs cultivadas en hipoxia en ausencia de bFGF, 2i u otros tratamientos capaces de provocar este fenómeno (Matsui et al., 1992; Resnick et al., 1992; Durcova-Hills et al., 2008; Leitch et al., 2010). La pluripotencialidad de estas células se ha demostrado funcionalmente por su capacidad de agregación a mórulas y la integración en blastocistos hospedadores *in vivo*.

Este efecto de la hipoxia en la adquisición de pluripotencialidad va en consonancia con diversos estudios que relacionan el desarrollo y mantenimiento de las células madre pluripotentes con las condiciones de baja concentración de oxígeno. *In vivo* esta relación se ve durante el desarrollo temprano (Ezashi et al., 2005), el entorno en el que se encuentran las células madre hematopoyéticas y mesenquimales de la médula ósea (Cipolleschi et al., 1993) o el mantenimiento y la progresión de las células madre cancerígenas (Barnhart y Simon, 2007). Además, *in vitro*, diferentes tipos de células madre ven favorecidas características como la supervivencia, autorrenovación, el mantenimiento del estado indiferenciado o la expresión de marcadores de pluripotencialidad cuando son cultivadas en hipoxia, como las HSC, (Danet et al., 2003), NSC, (Gustafsson et al., 2005), células madre de neuroblastoma, (Axelson et al., 2005), y las ESC (Ezashi et al., 2005). Además recientemente, el tratamiento con CCCP, un agente que mimetiza la hipoxia, promueve pluripotencia en hESC e incrementa la expresión de genes de pluripotencia tales como Oct4, Sox2 y Nanog (Mandal et al., 2011).

Recientemente se han utilizado las condiciones hipóxicas para mejorar la eficiencia de obtención de iPSCs, tanto de ratón como humanas, sugiriendo incluso un papel decisivo en esta reprogramación, al permitir la derivación de iPSCs utilizando sólo Oct4 y Klf4 (Yoshida et al., 2009).

## 2. Eficiencia de inducción de pluripotencia en PGCs por hipoxia

En condiciones de normoxia con bFGF, esta eficiencia es normalmente del 1-2% (Durcova-Hills et al., 2006; Matsui y Tokitake, 2009; Leitch et al., 2010). En condiciones de hipoxia esta eficiencia aumenta hasta el 10%. Estos resultados concuerdan con el aumento de eficiencia observado en la derivación de iPSC en condiciones hipóxicas tanto en ratón como en humano (Yoshida et al., 2009). La eficiencia de derivación de EGCs también se ve incrementada a unos números similares a los obtenidos en este estudio cuando se añaden 2i (inhibidores de GSK3 y MEK) al cultivo de PGCs, tras ser éstas cultivadas previamente durante tres días en presencia del factor bFGF (Leitch et al., 2010). La adición a nuestro cultivo en hipoxia de estos mismos inhibidores no incrementó de forma significativa la eficiencia de

generación de las hiEGLs, lo cual podría ser explicado por el hecho de que la hipoxia induce un efecto en la estabilización de la proteína HIF-1 $\alpha$  que es dependiente de la activación de la vía de señalización PI3K/Akt y de la ya inactiva vía de señalización de GSK3 $\beta$  (Mottet et al., 2003). De hecho, nuestro análisis por *microarrays* muestra que la expresión de GSK3 $\beta$  es más baja en hiEGL y las verdaderas EGCs que en PGCs de 11,5 *d.p.c.*

### **3. La hipoxia induce características de pluripotencialidad pero no de inmortalidad en las hiEGL**

Las colonias de células hiEGL derivadas en condiciones de hipoxia no pudieron mantenerse durante un largo periodo de cultivo en medio estándar PGC/EGC. La disminución temprana de la expresión de los marcadores de la línea germinal Blimp1 y Stella inducida por la hipoxia en PGCs demostró que el proceso de reprogramación estaba teniendo lugar y nos indujo a pensar en una posible desdiferenciación de las PGCs en otro tipo de células madre pluripotentes, las EpiSCs, las cuales expresan también los marcadores SSEA1 y Oct4 y están estrechamente ligadas a la línea germinal (Gillith et al., 2012). Además, las EpiSC muestran unos niveles reducidos en la expresión de Stella (Brons et al., 2007) y se ha descrito que la expresión de Blimp1 es dispensable para su generación *in vitro* (Bao et al., 2012). Sin embargo, el cultivo de PGCs en condiciones de hipoxia en medios de cultivo específicos de EpiSCs redujo enormemente el número de células obtenidas. Además, la presencia de los marcadores c-kit (dato observado en nuestro laboratorio) y TNAP en las colonias hiEGL, ambos ausentes en las EpiSC (Brons et al., 2007) nos llevó a descartar la posibilidad de que las colonias obtenidas en hipoxia estuvieran formadas por células EpiSC y dio fuerza a la hipótesis de que si bien el proceso de reprogramación celular estaba teniendo lugar en las PGCs en condiciones de hipoxia, quizá este se estuviera produciendo de forma incompleta.

De forma muy interesante, nuestros resultados sugieren que la adquisición de pluripotencia y autorrenovación, dos características intrínsecas de células madre pluripotentes, son dos procesos diferencialmente regulados. Esta hipótesis está demostrada por el hecho de que nuestras células son pluripotentes, como lo demuestra su capacidad de agregación a mórulas y de integración en blastocistos hospedadores, pero por otro lado carecen de la capacidad de autorrenovación. En consonancia con esto, y mientras se llevaba a cabo la escritura de esta Tesis Doctoral, un grupo de autores demostró que la hipoxia aumentaba la formación de colonias iPSCs de ratón, pero sin embargo mostraron, al igual que en nuestro estudio, la dificultad de mantener a las mismas durante un largo periodo de tiempo, no sobreviviendo mas allá de 20 días en (Sugimoto et al., 2013).

#### **4. Las hiEGL son más parecidas a las EGCs que a otros tipos de células pluripotentes o a PGCs unipotentes**

Con el objetivo de caracterizar a las hiEGL y encontrar diferencias en los perfiles de expresión génica entre dichas células y el resto de poblaciones celulares analizadas, se llevó a cabo un análisis de la expresión génica a través de la técnica de *microarrays*. Los datos del análisis de *PCA* revelaron que tras comparar a las hiEGL con otros tipos de células pluripotentes, como EGC, ESC, EpiSC y con las PGC 11,5 d.p.c. usadas como control de células unipotentes, las hiEGL demostraron ser más parecidas a las células pluripotentes EGCs cultivadas en condiciones de hipoxia, como reveló el análisis por *Pairwise scatter plot*. Este análisis mostró también que el coeficiente de correlación medido entre las hiEGL y la población unipotente PGC 11.5 d.p.c fue menor que entre las hiEGL y las poblaciones pluripotentes. Estos datos indican que las hiEGL son más parecidas a las células pluripotentes analizadas y se encuentran más alejadas del tipo celular unipotente del cual provienen, lo que sugiere que los cambios inducidos en la expresión génica de las PGCs por la hipoxia están dirigidos hacia el proceso de reprogramación celular.

El análisis de la expresión génica diferencial representado por el *Heat map* mostró además que las poblaciones de células cultivadas en hipoxia (hiEGL, denominadas en el análisis PCG1 y PGC2 y la población EG) poseían de forma general un patrón de expresión muy similar y que difería sustancialmente del resto de poblaciones cultivadas en normoxia. Este dato sugiere que la variabilidad en la concentración de O<sub>2</sub> afecta significativamente a la expresión génica de las poblaciones celulares analizadas sometidas a dicha variación e induce un mismo patrón génico asociado a la hipoxia.

Se analizaron también los niveles de expresión de los genes clásicamente utilizados en la transfección para la generación de las células pluripotentes iPSCs. El análisis reveló en primer lugar, que los genes Sox2 y Lin28 veían disminuida su expresión en hiEGL y EGCs cultivadas en condiciones hipóxicas con respecto a PGCs y EGCs cultivadas en normoxia, lo que sugiere que la hipoxia induce mecanismos de represión de estos genes. En el caso de Oct4, se observó una desregulación de su expresión en hiEGL y EGCs en hipoxia, aunque se mantuvieron unos niveles de expresión intermedios. Por otro lado se observó que los niveles de RNAm de c-Myc eran bajos y muy similares en todas las poblaciones celulares analizadas. En el caso del factor KLF4 se observó que la hipoxia tampoco inducía la sobreexpresión de dicho factor en las hiEGL y en las EGC cultivadas en condiciones de hipoxia química se apreció una expresión génica intermedia respecto a las líneas de células ESC. Debido a problemas técnicos no se obtuvieron datos de los *microarrays* sobre el nivel de expresión de KLF4 en la líneas de células pluripotentes EGC en normoxia, usadas como control positivo. Para comprobar el efecto de la hipoxia en la expresión de KLF4 y c-Myc en las hiEGL y en la línea de células pluripotentes

EGC tanto en condiciones de normoxia como en hipoxia, se analizaron mediante técnicas de inmunofluorescencia los niveles de proteína de ambos factores. Los resultados revelaron la detección de ambos factores en la línea TGC-10 de EGCs cultivadas en normoxia. Estos resultados coinciden con los datos publicados previamente en los que líneas inmortales de células EGC de ratón sobreexpresan KLF4 y c-Myc (Durcova-Hills et al., 2008). Sin embargo no se detectaron niveles de proteína para ambos factores en las hiEGL, corroborando los datos de los *microarrays*. De forma muy interesante, la inmunofluorescencia llevada a cabo en células pluripotentes de la línea mEGCs TGC-10 cultivadas 4 horas en condiciones hipóxicas, reveló que transcurrido este corto periodo de tiempo ya se pudo apreciar una disminución en los niveles de proteína de ambos factores con respecto al cultivo en condiciones de normoxia, pudiéndose apreciar además senescencia celular en algunas colonias de mEGCs TGC-10 (datos observados en nuestro laboratorio). Observando dichos resultados, posteriormente se prolongó el tiempo de exposición a hipoxia de la línea de células pluripotentes mEGC TGC-10, y se comprobó que tras 48 horas en hipoxia dichas células habían desaparecido del cultivo. El conjunto de estos datos sugiere sorprendentemente por un lado, que la hipoxia disminuye la expresión de los factores de Yamanaka expresados de forma constitutiva en las PGCs (Oct4, Sox2 y Lin28) (Donovan y De Miguel, 2003; West et al., 2009) los cuales parecen ser cruciales para el normal desarrollo de las PGCs pero no activan por sí solos la capacidad duradera de autorrenovación *in vivo*. Para ello probablemente se requiera la expresión al mismo tiempo de otros factores (Klf4, c-Myc), los cuales no son inducidos por la hipoxia en las hiEGL, explicándose así la ausencia de inmortalidad de estas células. Por otro lado, la hipoxia reprime la autorrenovación de la línea de células pluripotentes y completamente reprogramadas mEGC TGC-10, probablemente por la inhibición de la expresión de los factores c-Myc y KLF4 e induce senescencia conduciendo a las mismas a la muerte celular. Esto último concuerda con la noción de que la generación de iPSC pluripotentes requiere la superación del proceso de senescencia celular por parte de dichas células, y que este proceso podría estar regido por Klf4 y p53 (Mali et al., 2008; Zhao et al., 2008).

El análisis por *microarrays* nos permitió también analizar la expresión de otros genes implicados en vías de señalización celular relacionadas con la pluripotencia y la autorrenovación. Una de las principales es la vía de STAT3, cuya actividad intracelular se requiere al mismo tiempo junto con factores de transcripción como c-Myc y KLF4 para mantener el estado de pluripotencialidad y autorrenovación dependiente de LIF en las células ESC (De Felici, 2011). Notablemente, las PGCs no expresan STAT3, sin embargo STAT3 aparece en PGCs tras ser cultivadas *in vitro* durante 3-4 días en presencia de bFGF (Durcova-Hills et al., 2008, De Felici, 2011) o en condiciones de hipoxia (observado en nuestro laboratorio), probablemente como una consecuencia previa del proceso de reprogramación. De hecho, la supresión de STAT3 en PGCs suprime la derivación a células EGCs (Leitch et al.,

2013). Estos datos están en consonancia con los observados en los *microarrays*, en los que los niveles de STAT3 en hiEGL están igualados a los de las otras líneas de células madre pluripotentes analizadas, con la excepción de la línea EGC en la cual se aprecia una acusada disminución en su expresión en hipoxia con respecto a normoxia. De forma muy interesante, estos mismos autores demostraron que la vía de señalización de LIF/STAT3 controla el proceso de autorrenovación en células ESC a largo plazo a través de un mecanismo dependiente de c-Myc, lo que apoya nuestra teoría de que la hipoxia afecta negativamente al proceso de autorrenovación de las células EGCs e hiEGLs a través de la represión de los factores de transcripción utilizados en la generación de iPSC.

La exposición de PGCs al factor de crecimiento bFGF en cultivo induce la reprogramación de las PGCs a EGCs, a través de un mecanismo en el cual se inactiva el complejo represor BLIMP1/PRMT5, necesario para la especificación de la línea germinal. Esta represión induce la activación de dianas génicas entre las cuales se encuentran KLF4, c-Myc y Dhx38 (Durcova-Hills et al, 2008). Durante la inducción de pluripotencia de las PGCs en hipoxia, disminuye la expresión de Blimp1 como muestra el análisis por RT-pPCR, y según los datos de *microarrays* las hiEGL disminuyen la expresión de PRMT5, necesario para la actividad de Blimp1, y aumentan la expresión de una de sus dianas génicas, Dhx38, sin embargo no se observa un incremento en la expresión de las otras dianas génicas KLF4 y c-Myc como se ha mencionado anteriormente. Por otro lado, recientemente se ha demostrado que la acción de bFGF en PGCs puede ser sustituida por la hiperactivación de AKT, un potente estimulador de la proliferación y la supervivencia que se encuentra “downstream” de la vía de señalización de PI3K, el cual puede ser activado por varios factores de crecimiento entre los que se encuentra bFGF (Kimura et al., 2008). En consonancia con ello, se ha demostrado que la inactivación del gen Pten, cuya función antagoniza las acciones de PI3K, aumenta la producción de células EGCs y la formación de teratomas testiculares (Kimura et al., 2003). De acuerdo con esto, se observa una disminución de la expresión del gen Pten en las hiEGL. El conjunto de estos datos, parece explicar algunos de los mecanismos moleculares alternativos a la sobreexpresión de los factores de crecimiento usados en la generación de iPSCs, por los cuales la hipoxia favorece la adquisición de la pluripotencia en las PGCs. Estos mecanismos incluyen la expresión de las hiEGL de los genes asociados a pluripotencia STAT3 y Dhx38 y la disminución de la expresión tanto del complejo represor Blimp1/PRMT5 como del gen Pten.

## **5. La inducción de pluripotencialidad en las PGCs por hipoxia está mediada por HIF-1**

Se estudiaron los posibles mediadores implicados en la reprogramación a hiEGL bajo las condiciones hipóxicas. Los Factores Inducidos por Hipoxia (HIFs) son los principales transductores de la adaptación celular a hipoxia. Tras detectar la expresión en el núcleo de HIF-

1 $\alpha$  en las PGC y colonias obtenidas cultivadas exclusivamente en hipoxia, los experimentos realizados con un inhibidor de HIF-1 $\alpha$  (Mitramicina) y con un inhibidor de su degradación (DMOG) demostraron que la inducción de pluripotencialidad de las PGCs por la hipoxia está mediada por el factor HIF-1  $\alpha$ . Se estudió también la posible implicación de HIF-2 $\alpha$  en este proceso, utilizando un inhibidor de su traducción, que dio lugar a una tendencia en la disminución de las colonias hiEGL obtenidas. Sin embargo los resultados no fueron significativos por lo que haría falta realizar un mayor número de experimentos para concluir un papel de activador de HIF-2 $\alpha$  en el proceso de reprogramación de las PGCs en hipoxia.

El análisis mediante los *microarrays* de la expresión de HIF-1 $\alpha$  reveló unos resultados aparentemente contradictorios, en los que su expresión se encontró disminuida en las poblaciones celulares cultivadas en hipoxia (EGCs y hiEGL) con respecto a las células cultivadas en normoxia. Datos recientes indican que el control de la expresión de HIF-1 $\alpha$  puede ser selectivamente regulado a nivel de transcripción, traducción y estabilidad de la proteína (Keith et al., 2011). HIF-1 $\alpha$  y HIF-2 $\alpha$  se inducen en condiciones de hipoxia y en normoxia el mecanismo de degradación dependiente de PHD-pVHL de ambos factores parece modularse de una forma similar. Sin embargo, se ha observado que la estabilidad a nivel de proteína para ambos factores puede verse también influenciada por el tiempo de exposición de las células a la hipoxia. Se ha descrito que el cultivo a largo plazo en hipoxia (48 horas) mantiene elevados los niveles de proteína de HIF-2 $\alpha$  y en contraste, la exposición de las células a hipoxia incrementa de forma precisa los niveles de HIF-1 $\alpha$ , pero tras varias horas éstos disminuyen. La explicación de esto parece encontrarse en la expresión mediada por HIF-1 $\alpha$  de transcritos antisentido del locus de *Hif1 $\alpha$* , resultando en la desestabilización de los niveles de mRNA de *Hif1 $\alpha$* , y por tanto en la gradual disminución de la proteína HIF-1 $\alpha$  (Uchida et al., 2004). El conjunto de estos datos parece explicar los resultados obtenidos en nuestro estudio, en los que por un lado, la exposición de las PGCs a una concentración de O<sub>2</sub> del 3% indujo la expresión de HIF-1 $\alpha$ , cuyos niveles de proteína se detectaron de forma temprana tras 8 horas de cultivo, y por otro, tras la exposición durante 6 días a hipoxia, los niveles de mRNA de *Hif1 $\alpha$*  en las hiEGL se mostraron disminuidos. Desde un punto de vista funcional, parece que la expresión del factor de transcripción HIF-1 $\alpha$  durante un breve periodo de tiempo en PGCs expuestas a hipoxia es suficiente para desencadenar una respuesta génica que conduce a la adquisición de pluripotencialidad de las PGCs, como demuestran los resultados obtenidos en los experimentos realizados con los fármacos que actúan sobre HIF-1 $\alpha$ .

Los HIFs son factores de transcripción que regulan gran cantidad de genes, entre los que se encuentran varios relacionados con la potencialidad celular, como c-Myc, Notch, Ets-1 y Oct4, además se ha visto que las ESC expresan elevados niveles de HIF-1 $\alpha$  incluso en normoxia (Coussens et al., 2010). Se ha descrito que la actividad transcripcional de c-Myc está promovida por HIF-2 $\alpha$  en varias líneas celulares (Gordan et al., 2007a), aunque al mismo tiempo HIF-1 $\alpha$

antagoniza la función de c-Myc (Gordan et al., 2007b). Estos papeles contrapuestos de ambos factores HIF's sobre c-Myc, podrían explicar nuestros resultados, en los que la ausencia del factor c-Myc en las hiEGL podría estar mediada por la presencia de HIF-1 $\alpha$  y la ausencia de HIF-2 $\alpha$  en las PGCs en hipoxia. Entre los genes regulados por HIF-1 $\alpha$  se encuentra Notch (Gustafsson et al., 2005; Keith y Simon, 2007). La familia de receptores Notch está implicada en la determinación del destino celular así como en el mantenimiento y diferenciación de células madre (Hansson et al., 2004). Notch ve aumentada su expresión en hiEGL y EGC cultivadas en hipoxia con respecto a PGC 11,5 *d.p.c.* y EGCs cultivadas en normoxia, según datos de los *microarrays* (Tabla 7). En consonancia con nuestros resultados, la estabilización de HIF-1 $\alpha$  aumenta la actividad de Notch en hipoxia en la línea de embrionaria de teratocarcinoma de ratón, P19 (Gustafsson et al., 2005). En células hESC, la hipoxia previene su diferenciación a través de la activación de Notch y por el contrario, la inhibición de Notch conduce a un aumento de diferenciación de ESC en condiciones de hipoxia (Prasad et al., 2009). Otra diana génica de HIF-1 $\alpha$  es el gen *Ets-1*, que codifica para un factor de transcripción relacionado con el desarrollo de las células madre y la progresión tumoral (Dwyer et al., 2007). En nuestro estudio, la expresión de dicho gen no se vio incrementada en las hiEGL y EGC en hipoxia con respecto a PGCs y EGC en normoxia, lo cual podría indicar que existe algún mecanismo alternativo de represión de este gen. Se ha descrito que el gen *Ets-1* es diana de la vía de señalización de MEK/ERK (Khanna et al., 2011). De forma muy interesante, la inhibición de la actividad de ERK ha demostrado aumentar la eficiencia de derivación de mESC a partir de embriones de ratón (Buehr y Smith, 2003) y el tratamiento con 2i (sistema de inhibición de GSK3 y MEK/ERK) tiene un efecto beneficioso sobre la inducción de iPSC de ratón (Silva et al., 2008; Yoshida et al., 2009). En nuestros experimentos no se observó ninguna mejora en la inducción de pluripotencialidad al combinar el tratamiento de 2i con la hipoxia, lo cual podría explicarse por la redundancia del mecanismo, como hemos visto anteriormente. Los paralelismos existentes entre el efecto de la hipoxia y de los 2i pueden estar indicando similitudes en su mecanismo de actuación, y por tanto la activación o inhibición de genes diana de ambas vías de señalización, como podría ser en este caso, la inhibición de la expresión del gen *Ets-1*.

## **6. La hipoxia provoca variaciones en la expresión de Oct4 en PGC**

Oct4 es un factor de transcripción clave en el mantenimiento de la potencialidad celular, el cual mantiene la autorrenovación en las células madre embrionarias e inhibe su diferenciación (Loh et al., 2006). Oct4 se expresa a niveles bajos en PGCs en estadio embrionario (Sabour et al., 2011) y es imprescindible para su supervivencia (Kehler et al., 2004). Su papel central en la adquisición de pluripotencialidad queda demostrado al ser el único factor cuya transfección resulta imprescindible en la formación de iPSC, independientemente del origen de las células



transfectadas (Kim et al., 2009), no pudiendo reemplazarse por otros miembros de la familia de Oct (Nakagawa et al., 2008). En células ESC, cambios sutiles en los niveles de Oct4 resultan en cambios dramáticos durante la diferenciación de ESC: un aumento de dos veces en su nivel de expresión induce diferenciación hacia mesodermo, mientras que un descenso en la misma proporción cambia el destino de la diferenciación hacia trofoectodermo (Niwa et al., 2000). Se ha descrito también que durante la derivación de iPSC, la variación en la estequiometría de partes iguales de expresión de los 4 factores de Yamanaka conduce a efectos desfavorables en la eficiencia de reprogramación de las células somáticas, con la única excepción de Oct4, en la que un aumento en su expresión con respecto a los otros factores conduce a un incremento en la eficiencia de inducción de las iPSC (Papapetrou et al., 2009). Además la activación transcripcional de genes diana específicos de Oct4 es suficiente para la inducción de pluripotencialidad (Hammachi et al., 2012).

En nuestro estudio, Oct4 es el único de los factores de transcripción de Yamanaka analizados que mantiene unos niveles de expresión intermedios en hiEGL con respecto a PGCs de 11,5 *d.p.c.* y líneas de células pluripotentes. Con el fin de profundizar más en la relación entre Oct4 e hipoxia y sabiendo que la hipoxia puede regular la expresión de Oct4, ya sea de forma negativa en EBs provenientes de mESC (Lee et al., 2012), o positiva en células diferenciadas derivadas de hESC, en las que la hipoxia conduce una reactivación del promotor de Oct4 (Mathieu et al., 2013) se comparó la expresión de dicho factor en PGC de 8,5 *d.p.c.* cultivadas en normoxia e hipoxia durante 4 días y se analizaron los niveles de expresión del transgen Oct4-GFP. El experimento reveló una expresión homogénea de Oct4-GFP en las PGCs cultivadas en normoxia, mientras que la expresión de dicho transgen en hipoxia demostró ser significativamente más heterogénea. Tras un cultivo de 9 días de las PGCs en ambas condiciones, el cultivo en normoxia carecía de células SSEA1 u Oct4-GFP positivas, mientras que en hipoxia todavía podían detectarse algunas hiEGL positivas para ambos marcadores. Estos datos sugieren que la desregulación de Oct4 en las PGCs proporciona una ventaja adaptativa para la supervivencia en condiciones de cultivo en hipoxia, como se ha demostrado en otros tipos celulares como las células endoteliales (Härtel et al., 2010). Para caracterizar más la desregulación de Oct4 observada en la citometría llevada a cabo con PGCs en hipoxia, se aislaron PGCs individuales para monitorizar la expresión del transgen Oct4-GFP cada día. Sorprendentemente, la mayoría de las colonias obtenidas de hiEGL provinieron de PGCs con un bajo nivel de expresión de GFP. De forma muy interesante, muy recientemente se ha descrito que una reducida expresión de Oct4 conduce a un estado de pluripotencia robusto en ESC (Karwacki-Neisius et al., 2013). Esto está apoyado también por el hecho de que una redefinición baja en los niveles de Oct4 es esencial para la entrada en pluripotencia de las ESC mientras que unos niveles elevados de Oct4 son requeridos para su diferenciación (Radziszewska et al.,

2013). Nuestros datos sugieren que la hipoxia induce un amplio rango amplio en los niveles de Oct4 en PGCs, lo que favorece tanto la inducción de pluripotencia como la formación de colonias propensas a diferenciación en nuestros cultivos. En ESC la regulación a la baja de Oct4 promueve el aumento de expresión de Wnt3a (Karwacki-Neisius et al., 2013), que a su vez actúa junto con LIF para promover la autorrenovación de ESC a través de la vía de señalización LIF/STAT3 a largo plazo. Sin embargo en nuestras células hiEGL, aunque STAT3 mantenga unos niveles de expresión similares a los de las líneas pluripotentes analizadas, Wnt3a no ve aumentada su expresión, lo que podría contribuir a la falta de autorrenovación de las hiEGL.

## **7. La hipoxia afecta a las diferentes fases del proceso de reprogramación de las hiEGL**

Recientemente se ha descrito que el proceso de reprogramación de células diferenciadas para la obtención de iPSC consta de tres fases: iniciación, maduración y estabilización (Li et al., 2010; Samavarchi-Tehrani et al., 2010; Buganim et al., 2012; Golipour et al., 2012), cada una de las cuales está conducida por la expresión de determinados genes. En nuestro análisis por *microarrays* encontramos que tanto Trp53 (p53) como Cdh1 (Cadherin1) (Tabla 7), dos de los genes necesarios en el proceso de iniciación, están expresados en las hiEGL. En el caso de Cdh1 se observa además una sobreexpresión en hiEGL y EGCs cultivadas en hipoxia con respecto a las PGCs, lo que sugiere que la hipoxia induce la primera fase de iniciación. La mayoría de los genes típicos de la segunda fase, la de maduración, se expresan de forma igualitaria en las poblaciones analizadas, como Fbxo15, Gdf3, Sall4 (Tabla 7), (con la excepción de Oct4), lo que sugiere que las hiEGL han superado esta segunda fase. De forma muy interesante, los genes de la última fase, la de estabilización son los que se encuentran más diferencialmente expresados en hiEGL respecto de células pluripotentes. En esta fase se encuentran genes como Dppa3, Dppa4, Utf1, Eras, Lin28, Sox2 y Dnmt3l (Tablas 7 y 8). Estos datos sugieren que las hiEGL se encuentran en un estadio intermedio en el proceso de reprogramación, donde la fase de estabilización adquirida en las células totalmente reprogramadas parece incompleta en las hiEGL. De nuevo esto podría explicar porqué las células hiEGL son pluripotentes pero no inmortalas, y sugiere que la última fase de la reprogramación celular está más relacionada con la inmortalidad que con la potencia celular en la derivación de iPS.

## **8. Estudio de la relación entre hipoxia y metabolismo en las hiEGL**

La hipoxia induce un cambio metabólico en la célula necesario ante la escasa disponibilidad de oxígeno, lo que fuerza a la célula a abandonar o limitar su obtención de energía a partir de la fosforilación oxidativa sustituyéndola por un aumento de la glucólisis en forma de fermentación láctica (Shaw et al., 2006; Brahimi-Horn et al., 2007). Existen

numerosos estudios que relacionan directamente las células madre con el metabolismo glucolítico. Se ha observado que existe un cambio metabólico que se produce desde la fosforilación oxidativa a la glucólisis en mESC (Kondoh et al., 2007) similar al descrito en las células tumorales, las cuales presentan un metabolismo glucolítico incluso en condiciones de normoxia (lo que se conoce como efecto Warburg). Recientemente, se ha descrito que la inhibición de las vías oxidativas es importante en el mantenimiento de la pluripotencia (Yanes et al., 2010) y lo que es más importante, que el proceso de reprogramación celular viene acompañado por este cambio metabólico de fosforilación oxidativa a glucólisis (Zhang et al., 2012; Panopoulos et al., 2012). Estos últimos autores demostraron además que la reprogramación a un estado de pluripotencia es más eficiente cuanto más cerca esté el perfil metabólico de las células somáticas originales con respecto de las ESC, lo que sugiere un tipo de “memoria metabólica”. Se ha sugerido también que esta reprogramación metabólica debe ser superada para mejorar la eficiencia de inducción (Zhang et al., 2012). Además, existen estudios que muestran que este reajuste metabólico es un proceso activo que tiene lugar durante la reprogramación (Zhu et al., 2010; Folmes et al., 2011; Panopoulos et al., 2012) y al cual precede un incremento en la expresión de genes glucolíticos. Esto sugiere que este cambio metabólico tiene un rol temprano y constituye un proceso activo dentro de la reprogramación celular (Folmes et al., 2011). En consonancia con lo anterior, un estudio previo a esta tesis llevado a cabo por la directora de esta Tesis, la Dra. De Miguel, identificó mediante un ensayo de “hibridación de sustracción génica” genes relacionados con la glucólisis sobreexpresados en EGCs pluripotentes con respecto a PGCs. En nuestro estudio, este cambio metabólico parece darse en las hiEGL, como demuestra la sobreexpresión de genes relacionados con la glucólisis (Tabla 9) como Eno1 y 2, los transportadores de glucosa Glut 1 y Glut 3, y el incremento en la expresión del gen Slc4a8 el cual codifica para un transportador de bicarbonato, que parece jugar un papel importante en la regulación del pH intracelular en condiciones de hipoxia crónica (Chen et al., 2008). El conjunto de todos estos datos sugieren que el efecto de la hipoxia sobre la adquisición de pluripotencialidad en las PGC no sea debido exclusivamente a la regulación de factores de transcripción por parte de HIF, sino que también podrían estar implicados mecanismos moleculares inducidos por este cambio metabólico. Un posible mecanismo que une metabolismo y pluripotencia constituye la existencia de un bucle de retroalimentación positiva entre la glucólisis y el oncogen NF $\kappa$ B (Kawauchi et al., 2008), de tal forma que el estado de pluripotencia podría estar favorecido por la estimulación de este bucle de retroalimentación. De hecho, en el análisis de expresión génica encontramos que la expresión de NF $\kappa$ B1 se incrementa en las hiEGL y EGC cultivadas en hipoxia con respecto a PGCs.

## 9. Estudio de la relación entre hipoxia y epigenética en las hiEGL

Los datos aportados por los *microarrays* revelaron importantes diferencias génicas en la expresión de genes de remodelación de la cromatina en las hiEGL. Se ha visto además, que distintas líneas de EGCs pluripotentes muestran patrones en la metilación de su DNA muy heterogéneos dependiendo de si derivan de PGCs tempranas (8,5 *d.p.c*) o PGCs tardías (11,5-12,5 *d.p.c*) (De Felici, 2011). La exposición de las PGCs a un inhibidor de deacetilasas de histonas llamado TSA, puede sustituir al factor bFGF en la inducción de reprogramación de las PGCs (Durcova-Hills et al., 2008). De forma muy interesante, el KO de una deacetilasa de histonas llamada Sirt6 promueve un incremento en la expresión de HIF-1 $\alpha$  y en la actividad glucolítica (Zhong et al., 2010). De forma notable, un estudio más antiguo demostró que HIF-1 $\alpha$  activa la transcripción génica a través del reclutamiento de la acetil-transferasa de histonas p300/CBP (Arany et al., 1996), lo que podría llevar a pensar que Sirt6 probablemente compita con p300, manteniendo a las histonas en un estado hipoacetilado. Consistentes con estos resultados, la Dra. De Miguel y colaboradores demostraron que p300/CBP está aumentado en PGCs versus ESC y juega un importante rol en el desarrollo de las PGCs (Elliot et al., 2007).

Durante el desarrollo embrionario, las PGCs pregonadales durante su migración hacia las crestas genitales (8.5-10.5 *d.p.c.*), comienzan a sufrir un proceso amplio de desmetilación en todo el genoma, el cual se considera imprescindible tanto para el borrado de la impronta como para la reactivación del cromosoma X inactivo y los elementos móviles del genoma (Reik, 2007). Este proceso de desmetilación parece favorecer la inhibición de la vía de diferenciación hacia linajes somáticos y por otro la activación de la expresión de genes relacionados con la pluripotencia y genes específicos del linaje germinal lo que determina el destino de las PGCs. Este proceso se considera crucial para la restauración de la totipotencia latente en la línea germinal (Hayashi y Surani, 2009). Durante este estadio, la expresión de las tres DNA metilasas principales (DNMTs) codificadas por el genoma de mamíferos, la metiltransferasa de mantenimiento DNMT1 y las metiltransferasas de novo DNMT3a y DNMT3b, está reprimida. Además la expresión de DNMT3L, otro miembro de la familia DNMT3, que no posee actividad metiltransferasa, pero cuya actividad es requerida para las funciones de DNMT3a y DNMT3b también se encuentra reprimida (De Felici, 2011). En hiEGL la expresión de DNMT1 mantiene los mismos niveles de expresión que en las PGCs, como también lo hace su cofactor Uhrf1. Más interesante es el análisis de Dnmt3b y su regulador Dnmt3l en las hiEGL, en las cuales parece inducirse un ligero aumento en su expresión comparado con las células control PGC11.5 cultivadas en normoxia, aunque los niveles de expresión de ambas metiltransferasas en las hiEGL son significativamente menores que en las células ESC analizadas. Sin embargo en el caso de Dnmt3a parece no existir variación significativa en sus niveles de expresión, los cuales

se mantienen muy bajos tanto en hiEGL, como en PGC11.5 y las poblaciones de ESC analizadas.

El estado hipometilado global del DNA que sufren las PGCs migratorias, ocurre también en células de la ICM (en embriones tempranos preimplantacionales) y está asociado al estado de pluripotencia. En células ESC los niveles de metilación son muy heterogéneos, estando los loci de los genes clave de pluripotencia sin metilar, y genes de diferenciación altamente metilados (De Felici, 2011). Sin embargo, parece paradójico que el estado global de metilación de las células ESC se parezca más al de las células diferenciadas, en las cuales existen altos niveles de metilación en las islas CpG, mantenidos por la alta expresión de las DNMTs, lo que sugiere una reprogramación continua en su epigenoma (Ficz et al., 2011). Se cree que esto es debido a las condiciones de cultivo de las ESC (cultivadas en FBS + LIF) en las cuales existen en el suero señales de pro-diferenciación, las cuales están contenidas por la presencia de LIF. Sin embargo y según un reciente estudio, estas condiciones cambian, cuando las ESC son cultivadas en presencia de 2i+LIF, en las que se inhibe la vía de señalización ERK/GSK3, conduciendo a las ESC a un estado hipometilado global de su DNA e induciendo la represión de Dnmt3a, Dnmt3b y Dnmt3l, lo que podría inducir una reprogramación a un estado epigenético más parecido al de las células de la ICM o PGCs (Ficz et al., 2013). Estos datos concuerdan con nuestros datos de *microarrays* (Tabla 8) en los que las líneas de ESC analizadas (cultivadas en presencia de FBS y LIF) sobreexpresan dichas metiltransferasas. El conjunto de estos datos parecen un indicativo de que los mecanismos epigenéticos de desmetilación global del DNA que ocurren en las ESC en presencia de 2i+LIF, podrían mantenerse también en condiciones de hipoxia en las hiEGL. Sería interesante considerar un posterior estudio mediante la técnica de secuenciación bisulfito del estado epigenético global del genoma de las hiEGL y compararlo al de PGCs cultivadas en normoxia para comprobar si dichas células siguen conservando el patrón del estado de metilación global original de las PGCs y de las células de la ICM.

Otro de los mecanismos epigenéticos que operan en el genoma lo constituye la modificación de histonas. Existen gran cantidad de modificaciones, entre las que se encuentran la metilación (me) y la acetilación (ac) y ocurren principalmente en residuos del extremo amino terminal de las histonas nucleosomales H2A, H2B, H3, y H4. Estas modificaciones indican diferentes niveles de activación genómica, nombrándose mediante una clave que indica la histona modificada (p.ej.: H3), el residuo de aminoácido y su posición en la proteína (p.ej.: K27 indicaría lisina en la posición 27) y el tipo y número de modificaciones (p.ej.: me). En células madre pluripotentes los genes relacionados con el estado de célula madre presentan marcadores de cromatina activa como H3K4me o H3K9ac, mientras que los genes relacionados con un estado de célula totalmente diferenciada presentan marcadores de cromatina reprimida como H3K27me. Finalmente, aquellos genes que se expresan en células no totalmente diferenciadas, como las células madre multipotentes o unipotentes, presentan ambos tipos de marcadores de

histonas, tanto activadores como represores, definiendo así un estado bivalente (Vallier et al., 2009).

Las PGCs experimentan varios procesos de reprogramación epigenética de histonas durante el desarrollo embrionario. Tras su especificación en el epiblasto (6.5 *d.p.c.*) sufren una pérdida global del marcador H3K9me2 y un incremento de los marcadores H3K4me3 y H3K27me3, asociado a la reactivación del cromosoma X inactivo (Seki et al., 2005; Hajkova et al., 2008; Hayashi y Surani, 2009). El periodo de 8.0 *d.p.c.* en PGCs, se caracteriza por borrado de H3K9me2, una marca represora con una gran estabilidad y el aumento de H3K27me3, una marca represora con aparente plasticidad. La primera modificación ocurre a pesar de G9a (también conocida como EHMT2), una metiltransferasa de histonas con una fuerte actividad hacia H3-K9. La ausencia de GLP-2 (o EHMT1) necesario para formar el complejo activo G9a-GLP2 y/o la competición con la marca activadora de H3K9ac probablemente previene de la acción de G9a. Por otro lado, el aumento de H3K27me3 podría ser debido a la acción de EZH2, un miembro del grupo represor de enzimas, Polycomb (De Felici, 2011). De forma muy interesante Seki y colaboradores (Seki et al., 2007). descubrieron que los cambios en estas histonas ocurren progresivamente en las PGCs migratorias, dependiendo probablemente de su estado de maduración en el desarrollo. En nuestros estudios en hipoxia (Tabla 8), parece que los niveles de expresión de G9a aumentan ligeramente en hiEGL y EGC, aunque prácticamente son equiparables a la alta expresión de dicho gen en el resto de las poblaciones celulares analizadas. En cuanto a GLP-2, los niveles de expresión son bajos en todas las poblaciones y parece que la hipoxia los disminuye aun más en hiEGL y EGC. Sin embargo puede observarse una acusada disminución en la expresión del miembro del grupo Polycomb, Ezh2, en hipoxia y un acusado aumento en la expresión de Jmjd3, una demetilasa de histonas activadora de la cromatina, en las hiEGL con respecto a las PGCs control, igualando sus niveles de expresión al resto de las poblaciones pluripotentes analizadas. El aumento en la expresión de Jmjd3 posiblemente esté mediado por HIF-1 $\alpha$ , ya que miembros de la familia Jumonji constituyen un grupo de genes diana de HIF-1 (Semenza, 2011). En conjunto, parece que la expresión de las enzimas analizadas que operan sobre la modificación de histonas en las hiEGL se asemeja a la de las células pluripotentes. La función de estas enzimas parece en general asociarse a marcas activadoras de la cromatina, lo que conduciría a un estado transcripcionalmente activo del genoma de las hiEGL.

Además los datos aportados por *microarrays* revelaron una asombrosa disminución en la expresión de muchos genes remodeladores de la cromatina en las células cultivadas en hipoxia (Tabla 8), entre los que se encuentran genes pertenecientes a complejos de metil transferasas (Aebp2, Max, Ppp1cc, Ppp1ca, Rbbp7, Taf9), genes que forman parte de complejos remodeladores de la cromatina (Actb, Cbx5, Chd4, Ing3, Ruvbl1, Smarcc1, Uchl5), así como otros genes que codifican proteínas de unión a histonas (Hmgb2, Nfctc3, Tgif1, Prmt5, Rnf4,

Shmt2, Smarcc1, Smc1a, Tdrd3, Tle4, Uhrf1). La disminución global en la expresión de un gran número de genes con funciones diferentes asociadas a la remodelación cromatina bajo condiciones de hipoxia constituye un resultado muy interesante, que implica que la variación en la concentración de oxígeno ambiental pueda inducir cambios epigenéticos que conduzcan a silenciar o activar el genoma de una célula. En general a partir de nuestros datos podemos deducir que la hipoxia afecta a los mecanismos epigenéticos de las hiEGL, modificando la expresión de aquellos genes que codifican las enzimas encargadas de llevar a cabo estas modificaciones epigenéticas, lo cual regula la expresión génica modificando la estructura de la cromatina. Aunque estos indicios no nos permiten concluir que la inducción de pluripotencia en las hiEGLs sea debida exclusivamente a la modificación del estado epigenético, probablemente sí estén implicados en el proceso de reprogramación parcial que tiene lugar en las PGCs.

## **10. La hipoxia favorece la supervivencia celular y protege del daño oxidativo en hiEGL**

### **10.1. La hipoxia podría inducir mecanismos de protección frente al daño oxidativo a través de la expresión de PPAR $\gamma$ en PGCs**

En nuestro estudio los resultados de la RT-qPCR mostraron que la hipoxia inducía un gran incremento en la expresión del gen PPAR $\gamma$ . La familia de receptores PPARs actúan como reguladores transcripcionales claves del metabolismo lipídico, la biogénesis mitocondrial y como defensa al estrés oxidativo. Un estudio publicado recientemente implica a los receptores PPARs en un sistema de control de la degradación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y del daño oxidativo en un contexto de protección neuronal (Aleshin y Reiser, 2013). La generación de ROS por parte de la mitocondria constituye un proceso normal el cual es la consecuencia de la utilización de oxígeno para la generación de ATP en las células. Bajo determinadas condiciones, como la hipoxia, la mitocondria aumenta la producción de ROS, lo que dispara mecanismos de defensa contra el estrés oxidativo en la célula. En general el equilibrio entre la formación de ROS y las defensas antioxidantes permiten la homeostasis redox celular. Además, los ROS tienen un rol también en señalización celular. En el sistema cardiovascular se ha demostrado que en respuesta a estrés oxidativo, los ROS pueden actuar como moléculas de señalización activando la vía de PI3K/AKT lo que conduce a un incremento en la expresión de los receptores PPARs, los cuales finalmente activan la transcripción de genes antioxidantes (Kim y Yang, 2013). De forma muy interesante, la generación de ROS por parte de la enzima NOX promueve a través de un incremento de la actividad de PI3K/AKT, la autorrenovación y la neurogénesis en células NSC (Agathocleous et al., 2013).

En nuestro estudio se llevaron a cabo varios experimentos en los que se añadió al cultivo de PGCs en condiciones de normoxia un agonista del receptor PPAR $\gamma$ , pero resultados no

lograron el efecto inductor de la pluripotencialidad en PGCs visto con hipoxia. A partir de los datos obtenidos de nuestros experimentos, no podemos concluir que el receptor PPAR $\gamma$  y su vía de señalización celular estén implicados directamente en los mecanismos de reprogramación de PGCs en hipoxia. Sin embargo, cabe pensar que PPAR $\gamma$  podría tener un papel en la regulación de ROS manteniendo la homeostasis redox y favoreciendo la supervivencia de las PGCs en condiciones de hipoxia. Además, la generación de ROS en condiciones de hipoxia podrían promover la activación de la vía PI3K/AKT, la cual favorece el proceso de reprogramación de PGCs a EGCs, implicando indirectamente a los ROS en la adquisición de pluripotencialidad de las PGCs en hipoxia.

## **10.2. La hipoxia induce procesos de autofagia en hiEGL a través de la expresión de Bnip3**

Otro de los genes que mostró un gran incremento en su expresión en PGCs cultivadas en hipoxia en la RT-qPCR fue un gen proapoptótico denominado Bnip3. Este gen es un miembro de la subfamilia Bcl-2 de proteínas proapoptóticas mitocondriales. De hecho la exposición a hipoxia crónica de fibroblastos deficientes para HIF-1 resulta en muerte celular debido a un exceso en los niveles de ROS (Semenza, 2011). Sin embargo, existen muchos otros estudios en los que se demuestra la que hipoxia favorece la supervivencia y la proliferación celular, como ocurre en nuestro estudio, e incluso posee un papel muy importante en la progresión tumoral, como se ha mencionado anteriormente. En condiciones de hipoxia, uno de los significados adaptativos primarios del cambio metabólico oxidativo a glucolítico es el mantenimiento de la homeostasis redox celular. Cuando las células se exponen a condiciones de hipoxia crónica, se aumenta la generación de ROS por parte del complejo III de la cadena de transporte electrónico mitocondrial, y esto hace que se induzcan los niveles de la proteína HIF-1 $\alpha$  (Chandel et al., 2000). Para mantener esta homeostasis redox, la actividad de HIF-1 lleva a cabo diversas adaptaciones metabólicas. Una de estas adaptaciones implica la activación del gen Bnip3 por HIF-1 (Semenza, 2011). BNIP3 y BNIP3L (también conocido como BNIP3 $\alpha$  o Nix), otro miembro de la subfamilia de proteínas Bcl-2, forman heterodímeros y antagonizan la actividad de proteínas que promueven la supervivencia celular (Bcl-2 y Bcl-XL). Se ha demostrado que tanto BNIP3 como BNIP3L promueven la muerte celular. Por tanto, ¿cómo se explica que HIF-1 promueva la supervivencia celular? Parece ser que la respuesta está en que el complejo BNIP3/BNIP3L en condiciones de hipoxia tiene un rol positivo en la activación de uno de los mecanismos de supervivencia celular, la autofagia y la mitofagia (autofagia mitocondrial). El mecanismo postulado sería el siguiente: en condiciones de hipoxia, BNIP3/BNIP3L compete con Beclin-1, el principal inductor de autofagia y mitofagia en la célula, para unirse a Bcl-2, por tanto la liberación de Beclin-1 activa estos procesos (Bellot et al., 2009). La inhibición de la fosforilación oxidativa (por parte de inhibidores farmacológicos como CCCP, KCN, la



Antimicina A, o por determinadas condiciones como la hipoxia) pueden conducir a la generación de mitocondrias disfuncionales, en las que se genera un aumento en la producción de ROS. Estos ROS pueden dañar más las mitocondrias y se pueden liberar al citoplasma dañando otros orgánulos celulares. Para el mantenimiento de una correcta fisiología celular, la célula debe reconocer y seleccionar los orgánulos dañados, eliminándolos. Se ha postulado que la mitofagia y la autofagia constituyen mecanismos esenciales para mantener así la homeostasis celular (Bhatia-Kiššová y Camougrand, 2013).

Para demostrar que dichos procesos tenían lugar en las hiEGL, se tomaron fotografías con microscopía electrónica de los cultivos de los cultivos de PGCs tanto en hipoxia como en normoxia. Las fotografías mostraron que efectivamente, algunas de las hiEGL eran autofágicas y en otras se estaban produciendo procesos de mitofagia, al encontrar enormemente disminuido el número de mitocondrias con respecto a las PGCs cultivadas en condiciones de normoxia. Sin embargo, no todas las hiEGL del cultivo celular mostraron dichos procesos de autofagia. Esto explicaría, por un lado, el hecho de que la hipoxia a través de HIF-1 promueva la supervivencia a través de mecanismos de autofagia de algunas de las hiEGL de las colonias obtenidas. Aunque por otro lado, solo un pequeño número de células hiEGL exhibían dichos procesos de autofagia, mientras que el resto de las hiEGL observadas eran normales morfológicamente hablando, lo cual apoya el hecho de que la hipoxia, a través de HIF-1, favorece no solo la supervivencia sino también la pluripotencia de las hiEGL.

## *Conclusiones*

---



1. Bajo condiciones de hipoxia, las PGCs de ratón se reprograman a hiEGL, células con características de célula madre pluripotente, tales como la expresión de marcadores de pluripotencia, la formación de colonias y la capacidad de integrarse en blastocistos hospedadores de ratón.
2. La eficiencia de la inducción de pluripotencialidad en PGCs por hipoxia es de aproximadamente un 10%, superior a la obtenida con bFGF y similar a la eficiencia de derivación de EGCs obtenida con 2i+LIF.
3. Estas células carecen de autorrenovación ilimitada y poseen bajos niveles de expresión de los genes implicados en la inducción de iPSC (Sox2, Klf4, c-Myc y Lin28). La posibilidad de generar células pluripotentes con autorrenovación limitada puede resultar muy beneficioso en el campo de la terapia celular con células madre, por lo que se debe profundizar en su estudio.
4. Las células hiEGL se encuentran en un estado intermedio entre PGCs y EGCs, en el que han superado la fase de iniciación y maduración pero no han adquirido la última fase de estabilización necesaria para una reprogramación celular completa.
5. El factor de transcripción HIF-1 es el principal responsable de la inducción de pluripotencialidad en PGC por la hipoxia. El mecanismo de actuación implica variaciones en la cinética y la expresión de Oct4 inducidos por HIF-1, así como la inducción de un cambio metabólico oxidativo a glucolítico y la variación del estado epigenético de dichas células hacia un estado de desmetilación global de DNA parecido al que ocurre en las ESC.
6. La hipoxia favorece la supervivencia de las PGCs a través de inducción del gen PPAR $\gamma$ , el cual parece tener un papel en el mantenimiento de la homeostasis redox y la reducción del daño oxidativo y del gen Bnip3 que induce un proceso de mitofagia celular en el cual se eliminan mitocondrias disfuncionales que pueden generar ROS y dañar los orgánulos celulares, manteniendo así una adecuada homeostasis celular.

## *Bibliografia*

---



1. Aasen T, Raya A, Barrero MJ, Garreta E, Consiglio A, Gonzalez F, Vassena R, Bilić J, Pekarik V, Tiscornia G, Edel M, Boué S, Izpisua Belmonte JC. Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat Biotechnol.* 2008; 26 (11): 1276-84.
2. Agathocleous M, Harris WA. Metabolism in physiological cell proliferation and differentiation. *Trends Cell Biol.* 2013; 23(10):484-92.
3. Aleshin S, Reiser G. Role of the peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR)- $\alpha$ ,  $\beta/\delta$  and  $\gamma$  triad in regulation of reactive oxygen species signaling in brain. *Biol Chem.* 2013 Sep 7. pii: /j/bchm.just-accepted/hsz-2013-0215/hsz-2013-0215.xml.
4. Anderson R, Fässler R, Georges-Labouesse E, Hynes RO, Bader BL, Kreidberg JA, Schaible K, Heasman J, Wylie C. Mouse primordial germ cells lacking beta1 integrins enter the germline but fail to migrate normally to the gonads. *Development.* 1999; 126(8):1655-64.
5. Aoi T, Yae K, Nakagawa M, Ichisaka T, Okita K, Takahashi K, Chiba T, Yamanaka S. Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells. *Science.* 2008; 321(5889): 699-702.
6. Arany Z, Huang LE, Eckner R, Bhattacharya S, Jiang C, Goldberg MA, Bunn HF, Livingston DM. An essential role for p300/CBP in the cellular response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Nov 12;93(23):12969-73.
7. Avilion AA, Nicolis SK, Pevny LH, Perez L, Vivian N, Lovell-Badge R. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev.* 2003; 17(1):126-40.
8. Axelson H, Fredlund E, Ovenberger M, Landberg G, Pålman S. Hypoxia-induced dedifferentiation of tumor cells--a mechanism behind heterogeneity and aggressiveness of solid tumors. *Semin Cell Dev Biol.* 2005; 16 (4-5): 554-63.
9. Bao S, Leitch HG, Gillich A, Nichols J, Tang F, Kim S, Lee C, Zwaka T, Li X, Surani MA. The germ cell determinant Blimp1 is not required for derivation of pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell.* 2012; 11(1):110-7.

10. Barnhart BC, Simon MC. Metastasis and stem cell pathways. *Cancer Metastasis Rev.* 2007; 26(2):261-71.
11. Bartrons R, Caro J. Hypoxia, glucose metabolism and the Warburg's effect. *J Bioenerg Biomembr.* 2007; 39 (3): 223-9.
12. Bellot G, Garcia-Medina R, Gounon P, Chiche J, Roux D, Pouyssegur J, Mazure NM. Hypoxia-induced autophagy is mediated through hypoxia-inducible factor induction of BNIP3 and BNIP3L via their BH3 domains. *Mol Cell Biol.* 2009; 29(10):2570-81.
13. Bertout JA, Patel SA, Simon MC. The impact of O<sub>2</sub> availability on human cancer. *Nat Rev Cancer.* 2008; 8(12):967-75.
14. Bhatia-Kiššová I, Camougrand N. Mitophagy is not induced by mitochondrial damage but plays a role in the regulation of cellular autophagic activity. *Autophagy.* 2013; 9(11).
15. Boiani M, Kehler J, Schöler HR. Activity of the germline-specific Oct4-GFP transgene in normal and clone mouse embryos. *Methods Mol Biol.* 2004; 254: 1-34.
16. Boyer LA, Lee TI, Cole MF, Johnstone SE, Levine SS, Zucker JP, Guenther MG, Kumar RM, Murray HL, Jenner RG, Gifford DK, Melton DA, Jaenisch R, Young RA. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell.* 2005; 122(6):947-56.
17. Boyer LA, Plath K, Zeitlinger J, Brambrink T, Medeiros LA, Lee TI, Levine SS, Wernig M, Tajonar A, Ray MK, Bell GW, Otte AP, Vidal M, Gifford DK, Young RA, Jaenisch R. Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells. *Nature.* 2006; 441(7091):349-53.
18. Brahimi-Horn MC, Chiche J, Pouyssegur J. Hypoxia signalling controls metabolic demand. *Curr Opin Cell Biol.* 2007; 19(2):223-9.
19. Brahimi-Horn MC, Pouyssegur J. Oxygen, a source of life and stress. *FEBS Lett.* 2007; 581(19):3582-91.



20. Brinster RL. The effect of cells transferred into the mouse blastocyst on subsequent development. *J Exp Med*. 1974; 140(4):1049-56.
21. Brons IG, Smithers LE, Trotter MW, Rugg-Gunn P, Sun B, Chuva de Sousa Lopes SM, Howlett SK, Clarkson A, Ahrlund-Richter L, Pedersen RA, Vallier L. Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature*. 2007; 448(7150):191-5.
22. Buehr M, Smith A. Genesis of embryonic stem cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2003; 358(1436):1397-402.
23. Buganim Y, Faddah DA, Cheng AW, Itskovich E, Markoulaki S, Ganz K, Klemm SL, van Oudenaarden A, Jaenisch R. Single-cell expression analyses during cellular reprogramming reveal an early stochastic and a late hierarchic phase. *Cell*. 2012; 150(6):1209-22.
24. Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S, Smith A. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell*. 2003; 113(5):643-55.
25. Chandel NS, McClintock DS, Feliciano CE, Wood TM, Melendez JA, Rodriguez AM, Schumacker PT. Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  during hypoxia: a mechanism of O<sub>2</sub> sensing. *J Biol Chem*. 2000; 275(33):25130-8.
26. Chen LM, Haddad GG, Boron WF. Effects of chronic continuous hypoxia on the expression of SLC4A8 (NDCBE) in neonatal versus adult mouse brain. *Brain Res*. 2008; 1238:85-92.
27. Cherny RA, Stokes TM, Merei J, Lom L, Brandon MR, Williams RL. Strategies for the isolation and characterization of bovine embryonic stem cells. *Reprod Fertil Dev*. 1994; 6(5):569-75.
28. Chuva de Sousa Lopes SM, Hayashi K, Shovlin TC, Mifsud W, Surani MA, McLaren A X chromosome activity in mouse XX primordial germ cells. *PLoS Genet*. 2008; 4(2):e30.

29. Cipolleschi MG, Dello Sbarba P, Olivotto M. The role of hypoxia in the maintenance of hematopoietic stem cells. *Blood*. 1993; 82(7):2031-7.
30. Counter CM. The roles of telomeres and telomerase in cell life span. *Mutat Res*. 1996; 366(1):45-63.
31. Coussens M, Davy P, Brown L, Foster C, Andrews WH, Nagata M, Allsopp R. RNAi screen for telomerase reverse transcriptase transcriptional regulators identifies HIF1 $\alpha$  as critical for telomerase function in murine embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107(31):13842-7.
32. Covello KL, Kehler J, Yu H, Gordan JD, Arsham AM, Hu CJ, Labosky PA, Simon MC, Keith B. HIF-2 $\alpha$  regulates Oct-4: effects of hypoxia on stem cell function, embryonic development, and tumor growth. *Genes Dev*. 2006; 20 (5):557-70.
33. Danet GH, Pan Y, Luongo JL, Bonnet DA, Simon MC. Expansion of human SCID-repopulating cells under hypoxic conditions. *J Clin Invest*. 2003; 112(1):126-35.
34. De Felici M, Farini D, Dolci S. In or out stemness: comparing growth factor signalling in mouse embryonic stem cells and primordial germ cells. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2009; 4(2):87-97.
35. De Felici M. Nuclear reprogramming in mouse primordial germ cells: epigenetic contribution. *Stem Cells Int*. 2011; 2011:425863.
36. De Miguel MP, Cheng L, Holland EC, Federspiel MJ, Donovan PJ. Dissection of the c-Kit signaling pathway in mouse primordial germ cells by retroviral-mediated gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99(16): 10458-63.
37. De Miguel MP, Donovan PJ. Isolation and culture of embryonic germ cells. *Methods Enzymol*. 2003; 365:353-63.
38. De Miguel MP, Fuentes-Julián S, Alcaina Y. Pluripotent stem cells: origin, maintenance and induction. *Stem Cell Rev*. 2010; 6(4):633-49.

39. De Miguel MP, Kerr CL, López-Iglesias P, Alcaina Y. Techniques and conditions for embryonic germ cell derivation and culture. Michael S. Kallos (ed) Embryonic Stem Cells - Basic Biology to Bioengineering. Rijeka. Intech publishing. 2011; 22: 425-448.
40. Deng J, Shoemaker R, Xie B, Gore A, LeProust EM, Antosiewicz-Bourget J, Egli D, Maherali N, Park IH, Yu J, Daley GQ, Eggan K, Hochedlinger K, Thomson J, Wang W, Gao Y, Zhang K. Targeted bisulfite sequencing reveals changes in DNA methylation associated with nuclear reprogramming. *Nat Biotechnol.* 2009; 27(4):353-60.
41. Desbaillets I, Ziegler U, Groscurth P, Gassmann M. Embryoid bodies: an in vitro model of mouse embryogenesis. *Exp Physiol.* 2000; 85(6):645-51.
42. Diéguez-Hurtado R, Martín J, Martínez-Corral I, Martínez MD, Megías D, Olmeda D, Ortega S. A Cre-reporter transgenic mouse expressing the far-red fluorescent protein Katushka. *Genesis.* 2011; 49(1):36-45.
43. Doi A, Park IH, Wen B, Murakami P, Aryee MJ, Irizarry R, Herb B, Ladd-Acosta C, Rho J, Loewer S, Miller J, Schlaeger T, Daley GQ, Feinberg AP. Differential methylation of tissue- and cancer-specific CpG island shores distinguishes human induced pluripotent stem cells, embryonic stem cells and fibroblasts. *Nat Genet.* 2009; 41(12):1350-3.
44. Donovan PJ, De Miguel MP. Turning germ cells into stem cells. *Curr Opin Genet Dev.* 2003; 13(5): 463-71.
45. Donovan PJ, Stott D, Cairns LA, Heasman J, Wylie CC. Migratory and postmigratory mouse primordial germ cells behave differently in culture. *Cell.* 1986; 44(6):831-8.
46. Durcova-Hills G, Adams IR, Barton SC, Surani MA, McLaren A. The role of exogenous fibroblast growth factor-2 on the reprogramming of primordial germ cells into pluripotent stem cells. *Stem Cells.* 2006; 24(6):1441-9.
47. Durcova-Hills G, Ainscough J, McLaren A. Pluripotential stem cells derived from migrating primordial germ cells. *Differentiation.* 2001; 68(4-5):220-6.
48. Durcova-Hills G, Tang F, Doody G, Tooze R, Surani MA. Reprogramming primordial germ cells into pluripotent stem cells. *PLoS One.* 2008; 3(10):e3531.

49. Diabira S, Morandi X. Gliomagenesis and neural stem cells: Key role of hypoxia and concept of tumor "neo-niche". *Med Hypotheses*. 2008; 70(1):96-104.
50. Dwyer J, Li H, Xu D, Liu JP. Transcriptional regulation of telomerase activity: roles of the the Ets transcription factor family. *Ann N Y Acad Sci*. 2007; 1114:36-47.
51. Elliott AM, de Miguel MP, Rebel VI, Donovan PJ. Identifying genes differentially expressed between PGCs and ES cells reveals a role for CREB-binding protein in germ cell survival. *Dev Biol*. 2007; 311(2):347-58.
52. Eminli S, Foudi A, Stadtfeld M, Maherali N, Ahfeldt T, Mostoslavsky G, Hock H, Hochedlinger K. Differentiation stage determines potential of hematopoietic cells for reprogramming into induced pluripotent stem cells. *Nat Genet*. 2009; 41(9):968-76.
53. Eminli S, Utikal J, Arnold K, Jaenisch R, Hochedlinger K. Reprogramming of neural progenitor cells into induced pluripotent stem cells in the absence of exogenous Sox2 expression. *Stem Cells*. 2008; 26(10):2467-74.
54. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 1981; 292(5819):154-6.
55. Ezashi T, Das P, Roberts RM. Low O<sub>2</sub> tensions and the prevention of differentiation of hES cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; 102(13):4783-8.
56. Fenderson BA, Andrews PW, Nudelman E, Clausen H, Hakomori S. Glycolipid core structure switching from globo- to lacto- and ganglio-series during retinoic acid-induced differentiation of TERA-2-derived human embryonal carcinoma cells. *Dev Biol*. 1987; 122(1):21-34.
57. Fenderson BA, De Miguel MP, Pyle AD, Donovan PJ. Staining embryonic stem cells using monoclonal antibodies to stage-specific embryonic antigens. *Methods Mol Biol*. 2006; 325:207-24.
58. Feng B, Jiang J, Kraus P, Ng JH, Heng JC, Chan YS, Yaw LP, Zhang W, Loh YH, Han J, Vega VB, Cacheux-Rataboul V, Lim B, Lufkin T, Ng HH. Reprogramming of

- fibroblasts into induced pluripotent stem cells with orphan nuclear receptor Esrrb. *Nat Cell Biol.* 2009; 11(2):197-203.
59. Ficiz G, Branco MR, Seisenberger S, Santos F, Krueger F, Hore TA, Marques CJ, Andrews S, Reik W. Dynamic regulation of 5-hydroxymethylcytosine in mouse ES cells and during differentiation. *Nature.* 2011; 473(7347):398-402.
  60. Ficiz G, Hore TA, Santos F, Lee HJ, Dean W, Arand J, Krueger F, Oxley D, Paul YL, Walter J, Cook SJ, Andrews S, Branco MR, Reik W. FGF Signaling Inhibition in ESCs Drives Rapid Genome-wide Demethylation to the Epigenetic Ground State of Pluripotency. *Cell Stem Cell.* 2013; 13(3):351-9.
  61. Folmes CD, Nelson TJ, Martinez-Fernandez A, Arrell DK, Lindor JZ, Dzeja PP, Ikeda Y, Perez-Terzic C, Terzic A. Somatic oxidative bioenergetics transitions into pluripotency-dependent glycolysis to facilitate nuclear reprogramming. *Cell Metab.* 2011; 14(2):264-71.
  62. Forristal CE, Wright KL, Hanley NA, Oreffo RO, Houghton FD. Hypoxia inducible factors regulate pluripotency and proliferation in human embryonic stem cells cultured at reduced oxygen tensions. *Reproduction.* 2010; 139(1):85-97.
  63. Forsyth NR, Wright WE, Shay JW. Telomerase and differentiation in multicellular organisms: turn it off, turn it on, and turn it off again. *Differentiation.* 2002; 69(4-5):188-97.
  64. García-Castro MI, Anderson R, Heasman J, Wylie C. Interactions between germ cells and extracellular matrix glycoproteins during migration and gonad assembly in the mouse embryo. *J Cell Biol.* 1997; 138(2):471-80.
  65. Gardner RL. Clonal analysis of early mammalian development. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1985; 312(1153):163-78.
  66. Ginis I, Luo Y, Miura T, Thies S, Brandenberger R, Gerecht-Nir S, Amit M, Hoke A, Carpenter MK, Itskovitz-Eldor J, Rao MS. Differences between human and mouse embryonic stem cells. *Developmental Biology.* 2004; 269:360–80.
  67. Gillich A, Bao S, Grabole N, Hayashi K, Trotter MW, Pasque V, Magnúsdóttir E,

- Surani MA. Epiblast stem cell-based system reveals reprogramming synergy of germline factors. *Cell Stem Cell*. 2012; 10(4):425-39.
68. Gillich A, Hayashi K. Switching stem cell state through programmed germ cell reprogramming. *Differentiation*. 2011; 81(5):281-91.
69. Ginsburg M, Snow MH, McLaren A. Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. *Development*. 1990; 110(2):521-8.
70. Golipour A, David L, Liu Y, Jayakumaran G, Hirsch CL, Trecka D, Wrana JL. A late transition in somatic cell reprogramming requires regulators distinct from the pluripotency network. *Cell Stem Cell*. 2012; 11(6):769-82.
71. Gordan JD, Bertout JA, Hu CJ, Diehl JA, Simon MC. HIF-2alpha promotes hypoxic cell proliferation by enhancing c-myc transcriptional activity. *Cancer Cell*. 2007a; 11(4):335-47.
72. Gordan JD, Thompson CB, Simon MC. HIF and c-Myc: sibling rivals for control of cancer cell metabolism and proliferation. *Cancer Cell*. 2007b; 12(2):108-13.
73. Guo G, Yang J, Nichols J, Hall JS, Eyres I, Mansfield W, Smith A. Klf4 reverts developmentally programmed restriction of ground state pluripotency. *Development*. 2009; 136(7):1063-9.
74. Gustafsson MV, Zheng X, Pereira T, Gradin K, Jin S, Lundkvist J, Ruas JL, Poellinger L, Lendahl U, Bondesson M. Hypoxia requires notch signaling to maintain the undifferentiated cell state. *Dev Cell*. 2005; 9(5):617-28.
75. Hajkova P, Ancelin K, Waldmann T, Lacoste N, Lange UC, Cesari F, Lee C, Almouzni G, Schneider R, Surani MA. Chromatin dynamics during epigenetic reprogramming in the mouse germ line. *Nature*. 2008; 452(7189):877-81.
76. Hamanaka RB, Chandel NS. Mitochondrial reactive oxygen species regulate hypoxic signaling. *Curr Opin Cell Biol*. 2009 Dec;21(6):894-9.
77. Hammachi F, Morrison GM, Sharov AA, Livigni A, Narayan S, Papapetrou EP, O'Malley J, Kaji K, Ko MS, Ptashne M, Brickman JM. Transcriptional activation by

- Oct4 is sufficient for the maintenance and induction of pluripotency. *Cell Rep.* 2012; 1(2):99-109.
78. Hanna J, Markoulaki S, Schorderet P, Carey BW, Beard C, Wernig M, Creyghton MP, Steine EJ, Cassady JP, Foreman R, Lengner CJ, Dausman JA, Jaenisch R. Direct reprogramming of terminally differentiated mature B lymphocytes to pluripotency. *Cell.* 2008; 133(2):250-64.
  79. Hansson EM, Lendahl U, Chapman G. Notch signaling in development and disease. *Semin Cancer Biol.* 2004; 14(5):320-8.
  80. Härtel FV, Holl M, Arshad M, Aslam M, Gündüz D, Weyand M, Micoogullari M, Abdallah Y, Piper HM, Noll T. Transient hypoxia induces ERK-dependent anti-apoptotic cell survival in endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2010; 298(6):C1501-9.
  81. Hay DC, Sutherland L, Clark J, Burdon T. Oct-4 knockdown induces similar patterns of endoderm and trophoblast differentiation markers in human and mouse embryonic stem cells. *Stem Cells.* 2004; 22(2):225-35.
  82. Hayashi K, Surani MA. Resetting the epigenome beyond pluripotency in the germline. *Cell Stem Cell.* 2009; 4(6):493-8.
  83. Heng JC, Feng B, Han J, Jiang J, Kraus P, Ng JH, Orlov YL, Huss M, Yang L, Lufkin T, Lim B, Ng HH. The nuclear receptor Nr5a2 can replace Oct4 in the reprogramming of murine somatic cells to pluripotent cells. *Cell Stem Cell.* 2010; 6(2):167-74.
  84. Hockel M, Vaupel P. Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *J Natl Cancer Inst.* 2001; 93(4):266-276.
  85. Hu CJ, Iyer S, Sataur A, Covello KL, Chodosh LA, Simon MC. Differential regulation of the transcriptional activities of hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF-1alpha) and HIF-2alpha in stem cells. *Mol Cell Biol.* 2006; 26(9):3514-26.
  86. Hu CJ, Wang LY, Chodosh LA, Keith B, Simon MC. Differential roles of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and HIF-2alpha in hypoxic gene regulation. *Mol Cell Biol.* 2003; 23(24):9361-74.

87. Huang LE, Gu J, Schau M, Bunn HF. Regulation of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  is mediated by an O<sub>2</sub>-dependent degradation domain via the ubiquitin- proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 95(14):7987-92.
88. International Stem Cell Initiative. Characterization of human embryonic stem cell lines by the International Stem Cell Initiative. *Nat Biotechnol*. 2007; 25(7):803-16.
89. Irizarry RA, Bolstad BM, Collin F, Cope LM, Hobbs B, Speed TP. Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. *Nucleic Acids Res*. 2003; 31(4):e15.
90. Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, Salic A, Asara JM, Lane WS, Kaelin WG Jr. HIF $\alpha$  targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O<sub>2</sub> sensing. *Science*. 2001; 292(5516):464-8.
91. Iyer NV, Kotch LE, Agani F, Leung SW, Laughner E, Wenger RH, Gassmann M, Gearhart JD, Lawler AM, Yu AY, Semenza GL. Cellular and developmental control of O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor 1  $\alpha$ . *Genes Dev*. 1998; 12(2):149-62.
92. Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, von Kriegsheim A, Hebestreit HF, Mukherji M, Schofield CJ, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ. Targeting of HIF- $\alpha$  to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O<sub>2</sub>-regulated prolyl hydroxylation. *Science*. 2001; 292(5516):468-72.
93. Jaenisch R, Young R. Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. *Cell*. 2008; 132(4):567-82.
94. Jain S, Maltepe E, Lu MM, Simon C, Bradfield CA. Expression of ARNT, ARNT2, HIF1  $\alpha$ , HIF2  $\alpha$  and Ah receptor mRNAs in the developing mouse. *Mech Dev*. 1998; 73(1):117-23.
95. Jeong CH, Lee HJ, Cha JH, Kim JH, Kim KR, Kim JH, Yoon DK, Kim KW. Hypoxia-inducible factor-1  $\alpha$  inhibits self-renewal of mouse embryonic stem cells in Vitro via negative regulation of the leukemia inhibitory factor-STAT3 pathway. *J Biol Chem*. 2007; 282(18):13672-9.



96. Jia W, Yang W, Lei A, Gao Z, Yang C, Hua J, Huang W, Ma X, Wang H, Dou Z. A caprine chimera produced by injection of embryonic germ cells into a blastocyst. *Theriogenology*. 2008; 69(3):340-8.
97. Jiang J, Chan YS, Loh YH, Cai J, Tong GQ, Lim CA, Robson P, Zhong S, Ng HH. A core Klf circuitry regulates self-renewal of embryonic stem cells. *Nat Cell Biol*. 2008; 10(3):353-60.
98. Judson RL, Babiarz JE, Venere M, Bluelloch R. Embryonic stem cell-specific microRNAs promote induced pluripotency. *Nat Biotechnol*. 2009; 27(5):459-61.
99. Kallio PJ, Wilson WJ, O'Brien S, Makino Y, Poellinger L. Regulation of the hypoxia-inducible transcription factor 1alpha by the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem*. 1999; 274(10):6519-25.
100. Karwacki-Neisius V, Göke J, Osorno R, Halbritter F, Ng JH, Weiße AY, Wong FC, Gagliardi A, Mullin NP, Festuccia N, Colby D, Tomlinson SR, Ng HH, Chambers I. Reduced Oct4 expression directs a robust pluripotent state with distinct signaling activity and increased enhancer occupancy by Oct4 and Nanog. *Cell Stem Cell*. 2013; 12(5):531-45.
101. Kawauchi K, Araki K, Tobiume K, Tanaka N. p53 regulates glucose metabolism through an IKK-NF-kappaB pathway and inhibits cell transformation. *Nat Cell Biol*. 2008; 10(5):611-8.
102. Kehler J, Tolkunova E, Koschorz B, Pesce M, Gentile L, Boiani M, Lomelí H, Nagy A, McLaughlin KJ, Schöler HR, Tomilin A. Oct4 is required for primordial germ cell survival. *EMBO Rep*. 2004; 5(11):1078-83.
103. Keith B, Johnson RS, Simon MC. HIF1 $\alpha$  and HIF2 $\alpha$ : sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression. *Nat Rev Cancer*. 2011; 12(1):9-22.
104. Keith B, Simon MC. Hypoxia-inducible factors, stem cells, and cancer. *Cell*. 2007; 129(3):465-72.

105. Khanna A, Okkeri J, Bilgen T, Tiirikka T, Vihinen M, Visakorpi T, Westermarck J. ETS1 mediates MEK1/2-dependent overexpression of cancerous inhibitor of protein phosphatase 2A (CIP2A) in human cancer cells. *PLoS One*. 2011; 6(3):e17979.
106. Kidder BL, Yang J, Palmer S. Stat3 and c-Myc genome-wide promoter occupancy in embryonic stem cells. *PLoS One*. 2008; 3(12):e3932.
107. Kim K, Doi A, Wen B, Ng K, Zhao R, Cahan P, Kim J, Aryee MJ, Ji H, Ehrlich LI, Yabuuchi A, Takeuchi A, Cunniff KC, Hongguang H, McKinney-Freeman S, Naveiras O, Yoon TJ, Irizarry RA, Jung N, Seita J, Hanna J, Murakami P, Jaenisch R, Weissleder R, Orkin SH, Weissman IL, Feinberg AP, Daley GQ. Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2010; 467(7313):285-90.
108. Kim JB, Sebastiano V, Wu G, Araúzo-Bravo MJ, Sasse P, Gentile L, Ko K, Ruau D, Ehrlich M, van den Boom D, Meyer J, Hübner K, Bernemann C, Ortmeier C, Zenke M, Fleischmann BK, Zaehres H, Schöler HR. Oct4-induced pluripotency in adult neural stem cells. *Cell*. 2009; 136(3):411-9.
109. Kim T, Yang Q. Peroxisome-proliferator-activated receptors regulate redox signaling in the cardiovascular system. *World J Cardiol*. 2013; 5(6):164-74.
110. Kimura T, Suzuki A, Fujita Y, Yomogida K, Lomeli H, Asada N, Ikeuchi M, Nagy A, Mak TW, Nakano T. Conditional loss of PTEN leads to testicular teratoma and enhances embryonic germ cell production. *Development*. 2003; 130(8):1691-700.
111. Kimura T, Tomooka M, Yamano N, Murayama K, Matoba S, Umehara H, Kanai Y, Nakano T. AKT signaling promotes derivation of embryonic germ cells from primordial germ cells. *Development*. 2008; 135(5):869-79.
112. Kondoh H, Leonart ME, Nakashima Y, Yokode M, Tanaka M, Bernard D, Gil J, Beach D. A high glycolytic flux supports the proliferative potential of murine embryonic stem cells. *Antioxid Redox Signal*. 2007; 9(3):293-9.
113. Kozak KR, Abbott B, Hankinson O. ARNT-deficient mice and placental differentiation. *Dev Biol*. 1997; 191(2):297-305.

114. Labosky PA, Barlow DP, Hogan BL. Embryonic germ cell lines and their derivation from mouse primordial germ cells. *Ciba Found Symp.* 1994; 182:157-68.
115. Lando D, Peet DJ, Gorman JJ, Whelan DA, Whitelaw ML, Bruick RK. FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes Dev.* 2002; 16(12):1466-71.
116. Lawson KA, Dunn NR, Roelen BA, Zeinstra LM, Davis AM, Wright CV, Korving JP, Hogan BL. Bmp4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. *Genes Dev.* 1999; 13(4):424-36.
117. Lawson KA, Hage WJ. Clonal analysis of the origin of primordial germ cells in the mouse. *Ciba Found Symp.* 1994; 182:68-84.
118. Ledda S, Bogliolo L, Bebbere D, Ariu F, Pirino S. Characterization, isolation and culture of primordial germ cells in domestic animals: recent progress and insights from the ovine species. *Theriogenology.* 2010; 74(4):534-43.
119. Lee J, Inoue K, Ono R, Ogonuki N, Kohda T, Kaneko-Ishino T, Ogura A, Ishino F. Erasing genomic imprinting memory in mouse clone embryos produced from day 11.5 primordial germ cells. *Development.* 2002; 129(8):1807-17.
120. Lee SW, Jeong HK, Lee JY, Yang J, Lee EJ, Kim SY, Youn SW, Lee J, Kim WJ, Kim KW, Lim JM, Park JW, Park YB, Kim HS. Hypoxic priming of mESCs accelerates vascular-lineage differentiation through HIF1-mediated inverse regulation of Oct4 and VEGF. *EMBO Mol Med.* 2012; 4(9):924-38.
121. Leitch HG, Blair K, Mansfield W, Ayetey H, Humphreys P, Nichols J, Surani MA, Smith A. Embryonic germ cells from mice and rats exhibit properties consistent with a generic pluripotent ground state. *Development.* 2010; 137(14):2279-87.
122. Leitch HG, Nichols J, Humphreys P, Mulas C, Martello G, Lee C, Jones K, Surani MA, Smith A. Rebuilding pluripotency from primordial germ cells. *Stem Cell Reports.* 2013; 1(1):66-78.
123. Lengner CJ, Gimelbrant AA, Erwin JA, Cheng AW, Guenther MG, Welstead GG, Alagappan R, Frampton GM, Xu P, Muffat J, Santagata S, Powers D, Barrett CB,

- Young RA, Lee JT, Jaenisch R, Mitalipova M. Derivation of pre-X inactivation human embryonic stem cells under physiological oxygen concentrations. *Cell*. 2010; 141(5):872-83.
124. Li JY, Christophersen NS, Hall V, Soulet D, Brundin P. Critical issues of clinical human embryonic stem cell therapy for brain repair. *Trends Neurosci*. 2008; 31(3):146-53.
  125. Li R, Liang J, Ni S, Zhou T, Qing X, Li H, He W, Chen J, Li F, Zhuang Q, Qin B, Xu J, Li W, Yang J, Gan Y, Qin D, Feng S, Song H, Yang D, Zhang B, Zeng L, Lai L, Esteban MA, Pei D. A mesenchymal-to-epithelial transition initiates and is required for the nuclear reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell*. 2010; 7(1):51-63.
  126. Loh YH, Agarwal S, Park IH, Urbach A, Huo H, Heffner GC, Kim K, Miller JD, Ng K, Daley GQ. Generation of induced pluripotent stem cells from human blood. *Blood*. 2009; 113(22): 5476-9.
  127. Loh YH, Wu Q, Chew JL, Vega VB, Zhang W, Chen X, Bourque G, George J, Leong B, Liu J, Wong KY, Sung KW, Lee CW, Zhao XD, Chiu KP, Lipovich L, Kuznetsov VA, Robson P, Stanton LW, Wei CL, Ruan Y, Lim B, Ng HH. The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nat Genet*. 2006; 38(4):431-40.
  128. Maherali N, Sridharan R, Xie W, Utikal J, Eminli S, Arnold K, Stadtfeld M, Yachechko R, Tchieu J, Jaenisch R, Plath K, Hochedlinger K. Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. *Cell Stem Cell*. 2007; 1(1):55-70.
  129. Makino Y, Cao R, Svensson K, Bertilsson G, Asman M, Tanaka H, Cao Y, Berkenstam A, Poellinger L. Inhibitory PAS domain protein is a negative regulator of hypoxia-inducible gene expression. *Nature*. 2001; 414(6863):550-4.
  130. Mali P, Ye Z, Hommond HH, Yu X, Lin J, Chen G, Zou J, Cheng L. Improved efficiency and pace of generating induced pluripotent stem cells from human adult and fetal fibroblasts. *Stem Cells*. 2008; 26(8):1998-2005.

131. Maltepe E, Schmidt JV, Baunoch D, Bradfield CA, Simon MC. Abnormal angiogenesis and responses to glucose and oxygen deprivation in mice lacking the protein ARNT. *Nature*. 1997; 386(6623):403-7.
132. Mandal S, Lindgren AG, Srivastava AS, Clark AT, Banerjee U. Mitochondrial function controls proliferation and early differentiation potential of embryonic stem cells. *Stem Cells*. 2011; 29(3):486-95.
133. Marion RM, Strati K, Li H, Tejera A, Schoeftner S, Ortega S, Serrano M, Blasco MA. Telomeres acquire embryonic stem cell characteristics in induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. 2009; 4(2):141-54.
134. Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981; 78(12):7634-8.
135. Martin SK, Diamond P, Gronthos S, Peet DJ, Zannettino AC. The emerging role of hypoxia, HIF-1 and HIF-2 in multiple myeloma. *Leukemia*. 2011; 25(10):1533-42.
136. Masui S, Nakatake Y, Toyooka Y, Shimosato D, Yagi R, Takahashi K, Okochi H, Okuda A, Matoba R, Sharov AA, Ko MS, Niwa H. Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nat Cell Biol*. 2007; (6):625-35.
137. Mathieu J, Zhang Z, Nelson A, Lamba DA, Reh TA, Ware C, Ruohola-Baker H. Hypoxia Induces Re-Entry of Committed Cells into Pluripotency. *Stem Cells*. 2013; 31(9):1737-48.
138. Matsuda T, Nakamura T, Nakao K, Arai T, Katsuki M, Heike T, Yokota T. STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells. *EMBO J*. 1999; 18(15):4261-9.
139. Matsui Y, Tokitake Y. Primordial germ cells contain subpopulations that have greater ability to develop into pluripotential stem cells. *Dev Growth Differ*. 2009; 51(7):657-67.
140. Matsui Y, Zsebo K, Hogan BL. Derivation of pluripotential embryonic stem cells

- from murine primordial germ cells in culture. *Cell*. 1992; 70 (5): 841-7
141. McLaren A. Germ and somatic cell lineages in the developing gonad. *Mol Cell Endocrinol*. 2000; 163(1-2):3-9.
142. McLaren A. Primordial germ cells in the mouse. *Dev Biol*. 2003 Oct 1; 262(1):1-15.
143. Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, Segawa K, Murakami M, Takahashi K, Maruyama M, Maeda M, Yamanaka S. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell*. 2003; 113(5):631-42.
144. Moore KA, Lemischka IR. Stem cells and their niches. *Science*. 2006; 311(5769):1880-5.
145. Mottet D, Dumont V, Deccache Y, Demazy C, Ninane N, Raes M, Michiels C. Regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha protein level during hypoxic conditions by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/glycogen synthase kinase 3beta pathway in HepG2 cells. *J Biol Chem*. 2003; 278(33):31277-85.
146. Mullin NP, Yates A, Rowe AJ, Nijmeijer B, Colby D, Barlow PN, Walkinshaw MD, Chambers I. The pluripotency rheostat Nanog functions as a dimer. *Biochem J*. 2008; 411(2):227-31.
147. Muramatsu T, Muramatsu H. Carbohydrate antigens expressed on stem cells and early embryonic cells. *Glycoconj J*. 2004; 21(1-2):41-5.
148. Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, Okita K, Mochiduki Y, Takizawa N, Yamanaka S. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol*. 2008; 26(1):101-6.
149. Nichols J, Smith A. Naive and primed pluripotent states. *Cell Stem Cell*. 2009; 4(6):487-92.
150. Nichols J, Zevnik B, Anastassiadis K, Niwa H, Klewe-Nebenius D, Chambers I, Schöler H, Smith A. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell*. 1998; 95(3):379-91.

151. Nishi H, Nakada T, Kyo S, Inoue M, Shay JW, Isaka K. Hypoxia-inducible factor 1 mediates upregulation of telomerase (hTERT). *Mol Cell Biol.* 2004; 24(13):6076-83.
152. Niwa H, Burdon T, Chambers I, Smith A. Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. *Genes Dev.* 1998; 12(13):2048-60.
153. Niwa H, Miyazaki J, Smith AG. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet.* 2000; 24(4):372-6.
154. Oikawa M, Abe M, Kurosawa H, Hida W, Shirato K, Sato Y. Hypoxia induces transcription factor ETS-1 via the activity of hypoxia-inducible factor-1. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 289(1):39-43.
155. Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature.* 2007; 448(7151):313-7.
156. Okita K, Nakagawa M, Hyenjong H, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science.* 2008; 322(5903):949-53.
157. Okita K, Yamanaka S. Induced pluripotent stem cells: opportunities and challenges. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2011; 366(1575):2198-207.
158. Oosterhuis JW, Looijenga LH. Testicular germ-cell tumours in a broader perspective. *Nat Rev Cancer.* 2005; 5(3):210-22.
159. Panopoulos AD, Yanes O, Ruiz S, Kida YS, Diep D, Tautenhahn R, Herrerías A, Batchelder EM, Plongthongkum N, Lutz M, Berggren WT, Zhang K, Evans RM, Siuzdak G, Izpisua Belmonte JC. The metabolome of induced pluripotent stem cells reveals metabolic changes occurring in somatic cell reprogramming. *Cell Res.* 2012; 22(1):168-77.
160. Papapetrou EP, Tomishima MJ, Chambers SM, Mica Y, Reed E, Menon J, Tabar V, Mo Q, Studer L, Sadelain M. Stoichiometric and temporal requirements of Oct4, Sox2, Klf4, and c-Myc expression for efficient human iPSC induction and differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009; 106(31):12759-64.

161. Pauklin S, Pedersen RA, Vallier L. Mouse pluripotent stem cells at a glance. *J Cell Sci.* 2011; 124 (Pt 22):3727-32.
162. Pear WS, Aster JC. T cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma: a human cancer commonly associated with aberrant NOTCH1 signaling. *Curr Opin Hematol.* 2004; 11(6):426-33.
163. Pedersen M, Lofstedt T, Sun J, Holmquist-Mengelbier L, Pahlman S, Ronnstrand L. Stem cell factor induces HIF-1alpha at normoxia in hematopoietic cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008; 377(1):98-103.
164. Peng J, Zhang L, Drysdale L, Fong GH. The transcription factor EPAS-1/hypoxia-inducible factor 2alpha plays an important role in vascular remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 97(15):8386-8391.
165. Pepling ME, Spradling AC. Female mouse germ cells form synchronously dividing cysts. *Development.* 1998; 125(17):3323-8.
166. Pesce M, Wang X, Wolgemuth DJ, Schöler H. Differential expression of the Oct-4 transcription factor during mouse germ cell differentiation. *Mech Dev.* 1998; 71(1-2):89-98.
167. Peters H. Migration of gonocytes into the mammalian gonad and their differentiation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1970; 259(828):91-101.
168. Pick M, Stelzer Y, Bar-Nur O, Mayshar Y, Eden A, Benvenisty N. Clone- and gene-specific aberrations of parental imprinting in human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells.* 2009; 27(11):2686-90.
169. Pouyssegur J, Mechta-Grigoriou F. Redox regulation of the hypoxia-inducible factor. *Biol Chem.* 2006; 387(10-11):1337-46.
170. Prasad SM, Czepiel M, Cetinkaya C, Smigielska K, Weli SC, Lysdahl H, Gabrielsen A, Petersen K, Ehlers N, Fink T, Minger SL, Zachar V. Continuous hypoxic culturing maintains activation of Notch and allows long-term propagation of human embryonic stem cells without spontaneous differentiation. *Cell Prolif.* 2009; 42(1):63-74.



171. Quinn P, Harlow GM. The effect of oxygen on the development of preimplantation mouse embryos in vitro. *J Exp Zool.* 1978; 206(1):73-80.
172. Radzisheuskaya A, Chia Gle B, dos Santos RL, Theunissen TW, Castro LF, Nichols J, Silva JC. A defined Oct4 level governs cell state transitions of pluripotency entry and differentiation into all embryonic lineages. *Nat Cell Biol.* 2013; 15(6):579-90.
173. Ramalho-Santos J, Varum S, Amaral S, Mota PC, Sousa AP, Amaral A. Mitochondrial functionality in reproduction: from gonads and gametes to embryos and embryonic stem cells. *Hum Reprod Update.* 2009; 15(5): 553-72.
174. Reik W. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. *Nature.* 2007; 447(7143):425-32.
175. Resnick JL, Bixler LS, Cheng L, Donovan PJ. Long-term proliferation of mouse primordial germ cells in culture. *Nature.* 1992; 359(6395):550-1.
176. Rosner MH, Vigano MA, Ozato K, Timmons PM, Poirier F, Rigby PW, Staudt LM. A POU-domain transcription factor in early stem cells and germ cells of the mammalian embryo. *Nature.* 1990; 345(6277):686-92.
177. Rossant J, McBurney MW. The developmental potential of a euploid male teratocarcinoma cell line after blastocyst injection. *J Embryol Exp Morphol.* 1982; 70:99-112.
178. Rossant J, Papaioannou VE. The relationship between embryonic, embryonal carcinoma and embryo-derived stem cells. *Cell Differ.* 1984; 15(2-4):155-61.
179. Rugg-Gunn PJ, Ferguson-Smith AC, Pedersen RA. Status of genomic imprinting in human embryonic stem cells as revealed by a large cohort of independently derived and maintained lines. *Hum Mol Genet.* 2007; 16 Spec No. 2:R243-51.
180. Ryan HE, Lo J, Johnson RS. HIF-1 alpha is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. *EMBO J.* 1998; 17(11):3005-15.

181. Sabour D, Araúzo-Bravo MJ, Hübner K, Ko K, Greber B, Gentile L, Stehling M, Schöler HR. Identification of genes specific to mouse primordial germ cells through dynamic global gene expression. *Hum Mol Genet.* 2011; 20(1):115-25.
182. Saitou M. Germ cell specification in mice. *Curr Opin Genet Dev.* 2009; 19(4):386-95.
183. Saitou M, Yamaji M. Primordial germ cells in mice. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012; 4 (11). pii: a008375.
184. Samavarchi-Tehrani P, Golipour A, David L, Sung HK, Beyer TA, Datti A, Woltjen K, Nagy A, Wrana JL. Functional genomics reveals a BMP-driven mesenchymal-to-epithelial transition in the initiation of somatic cell reprogramming. *Cell Stem Cell.* 2010; 7(1):64-77.
185. Sasaki H, Matsui Y. Epigenetic events in mammalian germ-cell development: reprogramming and beyond. *Nat Rev Genet.* 2008; 9(2):129-40.
186. Schöler HR, Dressler GR, Balling R, Rohdewohld H, Gruss P. Oct-4: a germline-specific transcription factor mapping to the mouse t-complex. *EMBO J.* 1990; 9(7):2185-95.
187. Scortegagna M, Ding K, Oktay Y, Gaur A, Thurmond F, Yan LJ, Marck BT, Matsumoto AM, Shelton JM, Richardson JA, Bennett MJ, Garcia JA. Multiple organ pathology, metabolic abnormalities and impaired homeostasis of reactive oxygen species in *Epas1*<sup>-/-</sup> mice. *Nat Genet.* 2003; 35(4):331-40.
188. Shaw RJ. Glucose metabolism and cancer. *Curr Opin Cell Biol.* 2006; 18(6):598-608.
189. Seki Y, Hayashi K, Itoh K, Mizugaki M, Saitou M, Matsui Y. Extensive and orderly reprogramming of genome-wide chromatin modifications associated with specification and early development of germ cells in mice. *Dev Biol.* 2005; 278(2):440-58.
190. Seki Y, Yamaji M, Yabuta Y, Sano M, Shigeta M, Matsui Y, Saga Y, Tachibana M, Shinkai Y, Saitou M. Cellular dynamics associated with the genome-wide epigenetic reprogramming in migrating primordial germ cells in mice. *Development.* 2007; 134(14):2627-38.

191. Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2003; 3(10):721-32.
192. Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1: regulator of mitochondrial metabolism and mediator of ischemic preconditioning. *Biochim Biophys Acta*. 2011; 1813(7):1263-8.
193. Semenza GL, Wang GL. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol*. 1992; 12(12):5447-54.
194. Shambloott MJ, Axelman J, Wang S, Bugg EM, Littlefield JW, Donovan PJ, Blumenthal PD, Huggins GR, Gearhart JD. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 ;95(23):13726-31.
195. Sharova LV, Sharov AA, Piao Y, Shaik N, Sullivan T, Stewart CL, Hogan BL, Ko MS. Global gene expression profiling reveals similarities and differences among mouse pluripotent stem cells of different origins and strains. *Dev Biol*. 2007; 307(2):446-59.
196. Shim H, Gutiérrez-Adán A, Chen LR, BonDurant RH, Behboodi E, Anderson GB. Isolation of pluripotent stem cells from cultured porcine primordial germ cells. *Biol Reprod*. 1997; 57(5):1089-95.
197. Silva J, Barrandon O, Nichols J, Kawaguchi J, Theunissen TW, Smith A. Promotion of reprogramming to ground state pluripotency by signal inhibition. *PLoS Biol*. 2008; 6(10):e253.
198. Simon MC. Coming up for air: HIF-1 and mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metab*. 2006; 3(3):150-1.
199. Simon MP, Tournaire R, Pouyssegur J. The angiopoietin-2 gene of endothelial cells is up-regulated in hypoxia by a HIF binding site located in its first intron and by the central factors GATA-2 and Ets-1. *J Cell Physiol*. 2008; 217(3):809-18.

200. Singh SK, Kagalwala MN, Parker-Thornburg J, Adams H, Majumder S. REST maintains self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells. *Nature*. 2008; 453(7192):223-7.
201. Smith AG, Heath JK, Donaldson DD, Wong GG, Moreau J, Stahl M, Rogers D. Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature*. 1988; 336(6200):688-90.
202. Sowter HM, Raval RR, Moore JW, Ratcliffe PJ, Harris AL. Predominant role of hypoxia-inducible transcription factor (Hif)-1alpha versus Hif-2alpha in regulation of the transcriptional response to hypoxia. *Cancer Res*. 2003; 63(19):6130-6134.
203. Stadtfeld M, Brennand K, Hochedlinger K. Reprogramming of pancreatic beta cells into induced pluripotent stem cells. *Curr Biol*. 2008; 18(12):890-4.
204. Stevens LC. Origin of testicular teratomas from primordial germ cells in mice. *J Natl Cancer Inst*. 1967; 38(4):549-52;
205. Stewart CL, Gadi I, Bhatt H. Stem cells from primordial germ cells can reenter the germ line. *Dev Biol*. 1994; 161(2): 626-8.
206. Sugimoto K, Yoshizawa Y, Yamada S, Igawa K, Hayashi Y, Ishizaki H. Effects of hypoxia on pluripotency in murine iPS cells. *Microsc Res Tech*. 2013; 76(10):1084-92.
207. Surani MA, Hayashi K, Hajkova P. Genetic and epigenetic regulators of pluripotency. *Cell*. 2007; 128(4):747-62.
208. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007; 131(5):861-72.
209. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006; 126(4): 663-76.
210. Tam PP, Snow MH. Proliferation and migration of primordial germ cells during compensatory growth in mouse embryos. *J Embryol Exp Morphol*. 1981; 64:133-47.

211. Tam PP, Zhou SX. The allocation of epiblast cells to ectodermal and germ-line lineages is influenced by the position of the cells in the gastrulating mouse embryo. *Dev Biol.* 1996; 178(1):124-32.
212. Tesar PJ, Chenoweth JG, Brook FA, Davies TJ, Evans EP, Mack DL, Gardner RL, McKay RD. New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature.* 2007; 448(7150): 196-9.
213. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science.* 1998; 282(5391):1145-7.
214. Tian H, Hammer RE, Matsumoto AM, Russell DW, McKnight SL. The hypoxia-responsive transcription factor EPAS1 is essential for catecholamine homeostasis and protection against heart failure during embryonic development. *Genes Dev.* 1998; 12(21):3320-24.
215. Tian H, McKnight SL, Russell DW. Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Dev.* 1997; 11(1):72-82.
216. Uchida T, Rossignol F, Matthay MA, Mounier R, Couette S, Clottes E, Clerici C. Prolonged hypoxia differentially regulates hypoxia-inducible factor (HIF)-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  expression in lung epithelial cells: implication of natural antisense HIF-1 $\alpha$ . *J Biol Chem.* 2004; 279(15):14871-8.
217. Vallier L, Mendjan S, Brown S, Chng Z, Teo A, Smithers LE, Trotter MW, Cho CH, Martinez A, Rugg-Gunn P, Brons G, Pedersen RA. Activin/Nodal signalling maintains pluripotency by controlling Nanog expression. *Development.* 2009; 136(8):1339-49.
218. Van Gelder RN, von Zastrow ME, Yool A, Dement WC, Barchas JD, Eberwine JH. Amplified RNA synthesized from limited quantities of heterogeneous cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990; 87(5):1663-7.

219. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995; 92(12):5510-14.
220. Wang GL, Semenza GL. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem*. 1995; 270(3):1230-1237.
221. Warburg O, Posener K, Negelein E. Ueber den Stoffwechsel der Tumoren. *Biochemische Zeitschrift*. 1924 152:319-344. (German). Reprinted in: Warburg O. On metabolism of tumors Ed. Constable. London, 1930.
222. West JA, Viswanathan SR, Yabuuchi A, Cunniff K, Takeuchi A, Park IH, Sero JE, Zhu H, Perez-Atayde A, Frazier AL, Surani MA, Daley GQ. A role for Lin28 in primordial germ-cell development and germ-cell malignancy. *Nature*. 2009; 460(7257):909-13.
223. Westfall SD, Sachdev S, Das P, Hearne LB, Hannink M, Roberts RM, Ezashi T. Identification of oxygen-sensitive transcriptional programs in human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev*. 2008; 17(5):869-81.
224. Wiesener MS, Turley H, Allen WE, Willam C, Eckardt KU, Talks KL, Wood SM, Gatter KC, Harris AL, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Maxwell PH. Induction of endothelial PAS domain protein-1 by hypoxia: characterization and comparison with hypoxia-inducible factor-1alpha. *Blood*. 1998; 92(7):2260-8.
225. Yabuta Y, Kurimoto K, Ohinata Y, Seki Y, Saitou M. Gene expression dynamics during germline specification in mice identified by quantitative single-cell gene expression profiling. *Biol Reprod*. 2006; 75(5):705-16.
226. Yamaguchi S, Kimura H, Tada M, Nakatsuji N, Tada T. Nanog expression in mouse germ cell development. *Gene Expr Patterns*. 2005; 5(5):639-46.
227. Yamanaka S. A fresh look at iPS cells. *Cell*. 2009; 137(1):13-7.
228. Yanes O, Clark J, Wong DM, Patti GJ, Sánchez-Ruiz A, Benton HP, Trauger SA, Despons C, Ding S, Siuzdak G. Metabolic oxidation regulates embryonic stem cell differentiation. *Nat Chem Biol*. 2010; 6(6):411-7.

229. Yeom YI, Fuhrmann G, Ovitt CE, Brehm A, Ohbo K, Gross M, Hübner K, Schöler HR. Germline regulatory element of Oct-4 specific for the totipotent cycle of embryonal cells. *Development*. 1996; 122(3):881-94.
230. Ying QL, Nichols J, Chambers I, Smith A. BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell*. 2003; 115(3):281-92.
231. Yoshida Y, Takahashi K, Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Hypoxia enhances the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. 2009; 5(3):237-41.
232. Yoshimizu T, Obinata M, Matsui Y. Stage-specific tissue and cell interactions play key roles in mouse germ cell specification. *Development*. 2001; 128(4):481-90.
233. Yoshimizu T, Sugiyama N, De Felice M, Yeom YI, Ohbo K, Masuko K, Obinata M, Abe K, Schöler HR, Matsui Y. Germline-specific expression of the Oct-4/green fluorescent protein (GFP) transgene in mice. *Dev Growth Differ*. 1999; 41(6):675-84.
234. Yu J, Hu K, Smuga-Otto K, Tian S, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA. Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science*. 2009; 324(5928): 797-801.
235. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*. 2007; 318(5858): 1917-20.
236. Zhang J, Nuebel E, Daley GQ, Koehler CM, Teitell MA. Metabolic regulation in pluripotent stem cells during reprogramming and self-renewal. *Cell Stem Cell*. 2012; 11(5):589-95.
237. Zhao Y, Yin X, Qin H, Zhu F, Liu H, Yang W, Zhang Q, Xiang C, Hou P, Song Z, Liu Y, Yong J, Zhang P, Cai J, Liu M, Li H, Li Y, Qu X, Cui K, Zhang W, Xiang T, Wu Y, Zhao Y, Liu C, Yu C, Yuan K, Lou J, Ding M, Deng H. Two supporting factors greatly improve the efficiency of human iPSC generation. *Cell Stem Cell*. 2008; 3(5):475-9.

238. Zhong L, D'Urso A, Toiber D, Sebastian C, Henry RE, Vadysirisack DD, Guimaraes A, Marinelli B, Wikstrom JD, Nir T, Clish CB, Vaitheesvaran B, Iliopoulos O, Kurland I, Dor Y, Weissleder R, Shirihai OS, Ellisen LW, Espinosa JM, Mostoslavsky R. The histone deacetylase Sirt6 regulates glucose homeostasis via Hif1alpha. *Cell*. 2010; 140(2):280-93.
239. Zhou H, Wu S, Joo JY, Zhu S, Han DW, Lin T, Trauger S, Bien G, Yao S, Zhu Y, Siuzdak G, Schöler HR, Duan L, Ding S. Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell*. 2009; 4(5):381-4.
240. Zhu S, Li W, Zhou H, Wei W, Ambasudhan R, Lin T, Kim J, Zhang K, Ding S. Reprogramming of human primary somatic cells by OCT4 and chemical compounds. *Cell Stem Cell*. 2010; 7(6):651-5.



